

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBiotec

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DO PROCESSO
INFLAMATÓRIO NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA**

Camile Wünsch

Lajeado, dezembro de 2016

Camile Wunsch

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário Univates como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Verônica Contini

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Vargas
Fallavena

Lajeado, dezembro de 2016

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência
são como os timoneiros que entram no navio sem
timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu
destino”.*

(Leonardo da Vinci)

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Ademir e Carla, e ao meu namorado Fabiano, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, e pelo estímulo para buscar meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses últimos dois anos, diversas pessoas contribuíram para que eu chegasse ao final desse trabalho. Cada uma, à sua maneira, faz também parte dessa dissertação. Deixo aqui o meu muito obrigada às pessoas mais fundamentais.

Agradeço primeiramente à minha família, em especial aos **meus pais, Ademir e Carla**, que com certeza foram e sempre serão fundamentais na minha vida. Obrigada por me guiarem, pela tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não me deixarem desanimar com as dificuldades. Agradeço por tornarem possível a realização deste mestrado, pela ajuda nos momentos difíceis, pelo incentivo, motivação e principalmente agradeço pelo amor incondicional.

Ao meu namorado Fabiano, por seu amor, apoio e compreensão, pelo incentivo e por estar ao meu lado neste momento importante da minha vida, pela paciência e por entender minhas ausências.

As colegas de projeto de pesquisa, Fabiane, Pâmela, Stephanie, Kemberly, Ingrid, Caroline e Carolina, mesmo que algumas chegaram mais recentemente, agradeço pelo companheirismo, pelos vários momentos agradáveis, pelas fofocas intermináveis, gargalhadas, tardes regadas a chimarrão, pelos conselhos, pelas trocas de experiência e aprendizados e principalmente pelas palavras amigas nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, principalmente as meninas do grupo “Caquedo”, Mariana, Fabíola, Pricila, Débora e Tatiane, obrigada por estarem sempre ao meu lado, por me

animarem sempre que preciso, pelos almoços e jantadas maravilhosas, por horas e horas de conversas no whatsapp. Enfim, agradeço por essa amizade, pois mesmo que a vida não nos permita encontros rotineiros, sei que posso contar com vocês sempre.

Aos colegas do PPGBiotec, agradeço a amizade e convivência ao longo do curso, e em especial as colegas Dalana e Pâmela, muito obrigada por todo apoio, paciência e companheirismo sempre.

Aos professores do PPGBiotec, por todos os ensinamentos e “puxões de orelha” que me fizeram crescer, e principalmente à coordenação do Programa, que confiou em mim e me ajudou, juntamente com minha orientadora, no momento que mais precisei.

Ao meu coorientador, obrigada pelo suporte e colaboração prestada, pelo apoio e incentivo sempre.

E por fim, o agradecimento mais importante, **a minha orientadora**, profa. Dra. Verônica Contini, que há 6 anos vem sendo meu exemplo de pesquisadora, professora e pessoa, sendo fundamental na minha formação profissional e pessoal. Agradeço, principalmente pela confiança depositada e por acreditar em mim sempre, pela presença, por todos os ensinamentos, dedicação, apoio, amizade e por todos os conselhos, e claro, pela paciência.

RESUMO

Introdução: A doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, sendo caracterizada como uma doença inflamatória crônica, multifatorial, cuja fisiopatologia é a aterosclerose. Considerando a alta herdabilidade da doença, vários polimorfismos genéticos vêm sendo estudados e associados com o surgimento da DAC e, entre eles, destacam-se variantes nos genes *CD14*, *TLR4*, *NFKB1* e *TNFα*, os quais regulam a via de sinalização celular do sistema imune inato e desencadeiam o processo inflamatório na DAC. **Objetivo:** O objetivo principal deste estudo é verificar a possível associação de polimorfismos nos genes *CD14* (rs2569190), *TLR4* (rs4986790 e rs4986791), *NFKB1* (rs28362491) e *TNFα* (rs1800629 e rs361525) com a DAC. **Metodologia:** A amostra foi composta por 707 indivíduos adultos submetidos ao exame de cateterismo cardíaco no Hospital Bruno Born, de Lajeado, RS. Todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e responderam a um questionário semiestruturado. Os indivíduos foram classificados entre casos e controles, por um médico cardiologista, com base no seguinte critério: presença de estenose, com comprometimento maior do que 50%, em pelo menos uma das artérias coronárias. Foram também coletadas amostras de sangue periférico para análises bioquímicas e moleculares. A extração de DNA foi realizada pelo método de *salting out*. Os polimorfismos dos genes *CD14*, *TLR4* e *TNFα* foram genotipados pelo sistema de discriminação alélica TaqMan, em equipamento de reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real (StepOnePlus®). O polimorfismo rs28362491, no gene *NFKB1*, foi amplificado através da técnica convencional de PCR. **Resultados:** Identificamos uma associação dos polimorfismos rs2569190, localizado no gene *CD14*, e rs28362491, no gene *NFKB1*, com a DAC. Além disso, foram detectados efeitos dos polimorfismos dos genes *TLR4* e *TNFα* nos níveis glicêmicos e dos polimorfismos nos genes *TLR4*, *NFKB1* e *TNFα* no perfil lipídico. **Conclusão:** Nossos achados sugerem a participação de polimorfismos nos genes *CD14* e *NFKB1* no desenvolvimento da DAC na nossa amostra, corroborando evidências prévias do envolvimento de genes do processo inflamatório nessa patologia.

Palavras chave: Sistema imune inato, *CD14*, *TLR4*, *NFKB1* e *TNFα*.

ABSTRACT

Introduction: Coronary artery disease (CAD) is the main cause of morbidity and mortality in the world, being characterized as a chronic, multifactorial inflammatory disease, whose pathophysiology is atherosclerosis. Considering the high heritability of the disease, several genetic polymorphisms have been investigated and associated with CAD and, among them, there are variants in the *CD14*, *TLR4*, *NFKB1* and *TNF α* genes, which regulate cell signaling pathways of the innate immune system and inflammatory process in CAD. **Objective:** The main objective of this study is to verify the association between polymorphisms in the *CD14* (rs2569190), *TLR4* (rs4986790 and rs4986791), *NFKB1* (rs28362491) and *TNF α* (rs1800629 and rs361525) genes and CAD. **Methods:** The sample group was composed of 707 adult individuals, recruited at the time when they were brought in for coronary angiography procedures at the Hemodynamic Center of the Hospital Bruno Born, City of Lajeado, Rio Grande do Sul. The individuals were classified between cases and controls by a cardiologist, based on the following criteria: presence of stenosis, greater than 50% of the luminal diameter, in at least one of the coronary arteries. Peripheral blood samples were also collected for biochemical and molecular analyzes. DNA extraction was performed using the salting out method. The polymorphisms in the *CD14*, *TLR4* e *TNF α* genes were genotyped by Taqman® allelic discrimination assays. The rs28362491 polymorphism in the *NFKB1* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). **Results:** We identified an association between the polymorphisms rs2569190, located in the *CD14* gene, and rs28362491, located in the *NFKB1* gene, and CAD. In addition, there were detected significant effects of *TLR4* and *TNF α* gene polymorphisms on glycemic levels and *TLR4*, *NFKB1* and *TNF α* gene polymorphisms on the lipid profile. **Conclusion:** Our findings suggest a role for the polymorphisms in *CD14* and *NFKB1* genes in CAD susceptibility in our sample, corroborating previous evidence of the involvement of inflammatory process genes in this pathology.

Keywords: Innate immune system, *CD14*, *TLR4*, *NFKB1* and *TNF α* .

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: *Activator protein 1*

ApoB: Apolipoprotína B

ApoE: Apolipoproteína E

ACG: Arterite de células gigantes

AVC: Acidente vascular cerebral

CD14: *Cluster of Differentiation 14*

CK: Creatinoquinase

CK MB: Creatinoquinase fração MB

COEP: Comitê de Ética e Pesquisa

c-REL: Proteína com domínio REL

DAC: Doença arterial coronariana

DATASUS: Ministério da Saúde

DCNT: Doença crônica não transmissível

DCV: Doença cardiovascular

DECODE: *Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe*

DM: Diabetes mellitus

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ER: Escore de Risco

FUVATES: Fundação Vale do Taquari de Educação e Desenvolvimento Social

GWAS: *Genome-wide association study*

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HVE: Hipertrofia ventricular esquerda

HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

ICAM-1: Intercelular-1

IkB: Proteína inibitória da família de proteína REL

IL: Interleucina

IM: Infarto do miocárdio

IMC: Índice de massa corporal

IRAK: *Interleukin-1-receptor-associated kinase*

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LDL-ox: Lipoproteína de baixa densidade oxidada

LDLR: Receptor de lipoproteína de baixa densidade

LPS: Lipopolissacarídeos

MAF: *Minor allele frequency*

mCD14: CD14 de membrana

MD2: Molécula adaptadora

MDR: *Multifactor Dimensionality Reduction*

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MHC: Complexo de histocompatibilidade

miRNA: MicroRNA

MyD88: *Myeloid Differentiation Factor* – Fator de diferenciação Mieloide

mRNA: RNA mensageiro

NC: Não Calculado

NFkB: *Nuclear factor kappa B*

NFKB1: *Nuclear factor kappa B subunit 1*

NFKB2: *Nuclear factor kappa B subunit 2*

NK: Célula natural killer

PAD: Doença arterial periférica

PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos

PLINK: *Whole genome data analysis toolset*

PB: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PCR: Proteína C Reativa

PCSK9: *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptors*

OR: *Odds ratio*

REL: Domínio (RHD)

RELA: Proteína com domínio REL A

RELB: Proteína com domínio REL B

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RRP: Receptores de reconhecimento de padrão

SCA: Síndrome coronária aguda

sCD14: CD14 solúvel

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

SR: *Scavenger receptor*

STAT: *Statisc*

SUS: Sistema Único de Saúde

TAD: Domínio de transativação

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR: Receptor de antígeno nos linfócitos T

TGO: Transaminase glutâmico oxalacética

TGP: Transaminase glutâmico pirúvica

TIR: *Toll Interleucine Receptor*

TLR: *Toll-like Receptor*

TLR3: *Toll-like receptor 3*

TLR4: *Toll-like Receptor 4*

TNF α ou TNFA: *Tumor Necrosis Factor alpha*

TRAF6: *TNF-receptor-associated factor 6*

VCAM-1: *Cellular vascular-1*

WHO: *World Health Organization*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de formação da placa aterosclerótica.....	25
Figura 2 - Genes associados com doenças cardiovasculares.....	29
Figura 3 – Mecanismos de desenvolvimento da resposta imune inata.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos do polimorfismo do gene <i>CD14</i>	36
Tabela 2 – Estudos do polimorfismo do gene <i>TLR4</i>	40
Tabela 3 – Estudos do polimorfismo do gene <i>NFKB1</i>	44
Tabela 4 – Estudos do polimorfismo do gene <i>TNFα</i>	48
Tabela 5 – Características clínicas da amostra de acordo com o gênero.....	54
Tabela 6 – Características clínicas da amostra para caso-controle.....	55
Tabela 7 – Características dos polimorfismos.....	56
Tabela 8 – Associação dos polimorfismos com a doença arterial coronariana.....	56
Tabela 9 – Associação dos polimorfismos com a glicose.....	58
Tabela 10 – Associação dos polimorfismos com o perfil lipídico.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Tema	19
1.2 Problema	19
1.3 Hipótese	19
1.4 Objetivos	19
1.4.1 Objetivo geral	19
1.4.2 Objetivos específicos.....	20
1.5 Justificativa.....	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Caracterização epidemiológica da doença arterial coronariana.....	22
2.2 Caracterização clínica da doença arterial coronariana.....	23
2.3 Aterosclerose	24
2.4 Fatores de risco.....	27
2.4.1 Fatores genéticos.....	28
2.5 Sistema imunológico	30
2.5.1 CD14	34

2.5.1.1 Gene <i>CD14</i>	35
2.5.2 TLR4.....	36
2.5.2.1 Gene <i>TLR4</i>	38
2.5.3 NFkB.....	41
2.5.3.1 Gene <i>NFkB1</i>	42
2.6 Processo inflamatório	44
2.6.1 TNF α	46
2.6.1.1 Gene <i>TNFα</i>	47
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	49
3.1 Amostra	49
3.2 Coleta de dados	49
3.3 Análises laboratoriais	50
3.3.1 Análises bioquímicas.....	50
3.3.2 Extração de DNA.....	51
3.3.3 Análise genética	51
3.4 Análises Estatísticas	52
3.5 Aspectos éticos	52
3.6 Financiamento.....	53
4 RESULTADOS.....	54
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS	88

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

1 INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC) é uma doença multifatorial, complexa e com altos índices de morbidade e mortalidade, sendo considerada a principal causa de óbitos em todo o mundo. No Brasil, cerca de 300 mil pessoas morrem anualmente devido às doenças cardiovasculares. Esses altos índices de mortalidade e os altos custos em tratamentos, gastos pelo governo através do Sistema Único de Saúde (SUS), tornam essa patologia um grande problema de saúde pública (DATASUS, 2012, WHO, 2012; ROBERTS, 2014; GUVEN et al., 2015).

Do ponto de vista fisiopatológico, a DAC é determinada pela presença da aterosclerose, uma doença inflamatória crônica, caracterizada pelo acúmulo de substâncias lipídicas e matrizes fibrosas no endotélio das artérias de médio e grande calibre (BRASIL, 2013; ELSAID et al., 2014). Esse acúmulo de substâncias lipídicas é decorrente dos altos níveis séricos de colesterol que, em consequência, aumentam os níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL), que é carreadora do colesterol. O LDL-colesterol se acumula na parede dos vasos, sofrendo oxidação (LDL-ox) e atraindo, então, moléculas de adesão leucocitária e monócitos que, posteriormente,

se transformam em macrófagos, formando a placa aterosclerótica (HANSSON, 2005; DE CARVALHO et al., 2010; CANUEL et al., 2013).

A formação da placa aterosclerótica na DAC inicia devido à presença de vários fatores de riscos, bem descritos na literatura, como pressão arterial sistêmica elevada, dislipidemias, diabetes mellitus (DM), tabagismo, sedentarismo, gordura abdominal, entre outros (BRASIL, 2013; ANUJUO et al., 2015). Entretanto, apesar de bem estabelecidos esses fatores de risco, sabe-se que fatores genéticos também apresentam um papel importante na doença, cuja herdabilidade é estimada entre 40-50%. (ZDRAVKOVIC et al., 2001; ZDRAVKOVIC et al., 2007; PEDEN; FERRALL, 2011; ROBERTS, 2014) e, a partir de estudos de ligação, estudos de associação gene candidato e de varredura genômica (GWAS, do inglês *Genome-wide association study*), tem-se evidenciado vários *loci* gênicos envolvidos no desenvolvimento da DAC. Entre eles, destaca-se a região cromossômica 9p21, o gene do receptor de LDL (*LDLR*), o gene da Apolipoproteína-E (*ApoE*) e, mais recentemente, genes envolvidos na via de sinalização NFkB (*nuclear fator kappa B*), entre outros (CARDIOGRAMPLUSC4C CONSORTIUM et al., 2013; ROBERTS, 2014).

A via de sinalização celular envolvida na DAC consiste no reconhecimento do LDL-ox pelos macrófagos, através do receptor CD14 (*cluster of differentiation 14*) acoplado ao receptor de membrana TLR4 (*toll-like receptor 4*), com auxílio da molécula adaptadora MD2 (*myeloid differentiation 2*). O receptor TLR4 entra em contato com a proteína MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*), que emite sinais para dentro da célula liberando o NFkB, o qual entra no núcleo e ativa a transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α (*tumor necrosis fator alpha*), que irão desencadear o processo inflamatório da doença. Dessa forma, os genes *CD14*, *TLR4*, *NFKB1* e *TNF α* são os principais genes envolvidos no sistema imune inato, visto que as proteínas codificadas por eles desencadeiam o processo inflamatório na DAC (JIA et al., 2014; TUNDUP et al., 2015).

1.1 Tema

Investigação do efeito de polimorfismos em genes envolvidos no processo inflamatório (*CD14*, *TLR4*, *NFKB1* e *TNF α*) na DAC.

1.2 Problema

Os polimorfismos selecionados estão associados com a DAC na amostra investigada?

1.3 Hipótese

Os polimorfismos selecionados nos genes *CD14*, *TLR4*, *NFKB1* e *TNF α* , isoladamente ou em conjunto, estão associados com a DAC na amostra investigada.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é verificar a associação de polimorfismos nos genes *CD14* (rs2569190; -260C/T), *TLR4* (rs4986790; 896A/G e rs4986791; 1196 C/T), *NFKB1* (rs28362491; -94 ins/del ATTG;) e *TNF α* (rs1800629; -308G/A e rs361525; -238G/A) com a DAC.

1.4.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs2569190 (*CD14*), rs4986790 e rs4986791 (*TLR4*), rs28362491 (*NFKB1*) e rs1800629 e rs361525 (*TNF α*) em uma amostra de 707 indivíduos submetidos ao exame de cateterismo cardíaco no serviço de Hemodinâmica do Hospital Bruno Born de Lajeado, RS;
- b) Verificar se existe associação entre os polimorfismos selecionados e a DAC;
- c) Verificar se os polimorfismos selecionados influenciam as variáveis clínicas dos indivíduos incluídos no estudo;
- d) Testar o efeito de possíveis interações gene-gene nas variáveis clínicas da amostra investigada.

1.5 Justificativa

As doenças cardiovasculares (DCVs) por anos têm sido a principal causa de óbitos no mundo e estima-se que, até 2030, aproximadamente 23.6 milhões de pessoas terão morrido devido a essa patologia. Dentre as DCVs, a DAC é responsável pelo maior número de mortes, em comparação às demais doenças. Devido ao alto índice de mortalidade, a DAC é um grave problema de saúde pública, com altos custos para o Sistema Único de Saúde, no Brasil. Nesse sentido, uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessa doença pode abrir caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e/ou novos tratamentos.

Sabe-se que a predisposição genética tem uma grande importância no desenvolvimento da DAC e, de fato, os estudos de varredura genômica, que identificam genes implicados em doenças humanas através de pequenas variações no genoma, têm evidenciado associações significativas entre diversos polimorfismos genéticos e o desenvolvimento dessa patologia. Entretanto, apesar desses achados,

até o momento, nenhum gene de grande efeito foi identificado e novas estratégias de estudos têm sido desenvolvidas. Entre essas estratégias, alguns autores têm proposto o estudo de interações gene-gene, com base em hipóteses biológicas definidas *a priori*.

Baseado nas evidências científicas que demonstram a relação dos genes *CD14*, *TLR4*, *NFKB1* e *TNF α* com diversas doenças cardiovasculares, e nas evidências biológicas de interações entre os componentes codificados por esses genes, a hipótese principal deste estudo é que polimorfismos comuns nesse sistema podem influenciar, sozinhos ou em conjunto, a susceptibilidade à DAC. Com esse trabalho, pretendemos ajudar a esclarecer parte dos mecanismos genéticos envolvidos na DAC, na nossa população, possibilitando, futuramente, um conhecimento mais completo dessa patologia, visando um melhor diagnóstico, prevenção e o desenvolvimento de novas estratégias, mais adequadas e personalizadas, de tratamento.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICO

2.1 Caracterização epidemiológica da doença arterial coronariana

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como, por exemplo, as DCVs, o câncer, a doença respiratória crônica, o diabetes mellitus (DM) e a hipertensão arterial, são as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (DUNCAN et al., 2012; WHO, 2012). Dentre essas patologias, as DCVs são a causa número um de mortes, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos. A World Health Organization (WHO) estimou, em 2012, cerca de 17.5 milhões de mortes em todo o mundo por doenças cardíacas, o que representou 31% de todas as mortes naquele ano. No Brasil, 300 mil pessoas morrem anualmente por esse tipo de enfermidade. Desses altos índices de mortes mundiais, estima-se que 7.4 milhões foram devido a doença arterial coronariana (DAC). Acredita-se que, até 2030, cerca de 23.6 milhões de pessoas terão morrido por doenças cardiovasculares, segundo estimativas da WHO (WHO, 2016).

Os altos índices de mortes e, conseqüentemente, o elevado custo para o governo, especialmente quanto aos gastos com medicamentos e internações, através do SUS, fazem com que as DCVs sejam um grande problema para a saúde pública. Em relação aos custos com as doenças cardiovasculares, em 2009, o Ministério da Saúde (DATASUS) registrou 91.970 internações, totalizando um custo de R\$165.461.644,33. Já no ano de 2012, o número de internações foi ainda maior,

correspondendo a 242.858 internações, segundo o DATASUS, o que consequentemente gerou altos gastos para o governo (DATASUS, 2012; DE ANDRADE et al., 2013).

2.2 Caracterização clínica da doença arterial coronariana

O coração é um órgão muscular que funciona como uma bomba, cuja principal função é impulsionar o sangue através dos vasos sanguíneos, fazendo-o chegar a todas as células do organismo, fornecendo nutrientes essenciais e facilitando a eliminação de produtos residuais das células. Para esse bombeamento funcionar, o miocárdio (músculo do coração) necessita de suprimento adequado e contínuo de sangue e oxigênio (MESQUITA et al., 2004; THYGESEN et al, 2012).

As doenças cardiovasculares são um grupo de doenças que afetam o sistema circulatório, ou seja, atingem o impulsionamento do sangue através dos vasos sanguíneos pelo coração. Dentre as principais doenças, encontram-se a DAC (acomete os vasos coronários que abastecem o coração), a doença cerebrovascular (acomete os vasos sanguíneos que irrigam o cérebro) e a doença cardíaca congênita (malformações do coração presente antes mesmo do nascimento), cujas principais manifestações clínicas são, respectivamente, angina, derrames e infarto do miocárdio (IM), que são eventos agudos causados por um bloqueio nos vasos impedindo a fluidez do sangue para o coração ou para o cérebro (HANSSON; LIBBY, 2006; SILVA et al., 2013; WHO, 2016).

A DAC teve origem na medicina ocidental com a descrição de angina de peito (dor no peito), por William Heberden's, em 1768 e, posteriormente, Rudolf Virchow foi o primeiro descrever o quadro clínico da doença (KLINE; CONTI; WINCHESTER, 2015). A DAC é uma doença complexa, multifatorial, influenciada por uma combinação de fatores ambientais e genéticos, que está diretamente relacionada ao grau de obstrução do fluxo sanguíneo das artérias coronárias pelas placas ateroscleróticas, consequentemente, apresentando múltiplos estágios de desenvolvimento. De um modo geral, podemos dizer que a fisiopatologia da DAC é a aterosclerose (SAMANI;

SCHUNKERT, 2008; CANUEL et al., 2013; ELSAID et al., 2014; ROBERTS, 2014; GUVEN et al., 2015).

2.3 Aterosclerose

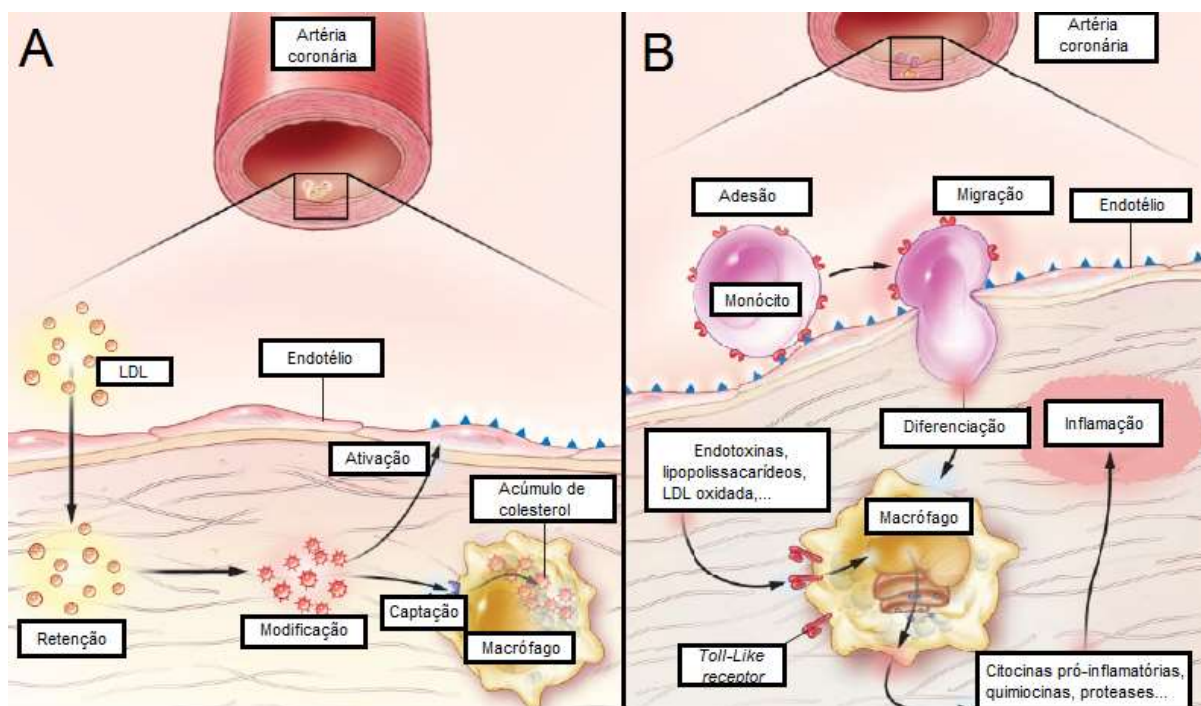
A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, multifatorial, que possui múltiplas etiologias, tais como infecção, hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia, principalmente. É caracterizada por uma lesão endotelial na camada íntima das artérias de médio e grande calibre, onde substâncias lipídicas e matrizes fibrosas se depositam, formando as placas ateroscleróticas. A formação da placa aterosclerótica é um importante fator de risco para aterosclerose e morte prematura por DAC (HANSSON, 2005; CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007; BORISSOFF; SPRONK; TEN CATE, 2011; LIMA-NETO et al., 2012; BRASIL, 2013; CANUEL et al., 2013; ELSAID et al., 2014; JIA et al., 2014).

Na corrente sanguínea, o colesterol é transportado por partículas de lipoproteínas, das quais 70% são lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Consequentemente, o nível elevado de colesterol aumenta o nível de lipoproteínas no sangue, o processo chave para o início da formação da placa aterosclerótica. Como decorrência, o aumento das lipoproteínas leva à disfunção endotelial, que aumenta a permeabilidade da camada íntima das artérias às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial, onde sofrem oxidação, formando a LDL oxidada (LDL-ox). O depósito de lipoproteínas na parede arterial ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (HANSSON, 2005; DE CARVALHO et al., 2010; BORISSOFF; SPRONK; TEN CATE, 2011; BRASIL, 2013; CANUEL et al., 2013).

A presença de LDL-ox estimula o surgimento de moléculas de adesão leucocitária no endotélio arterial (celular vascular-1 (VCAM-1) e intercelular-1 (ICAM-1)), outra manifestação da disfunção endotelial. As moléculas de adesão são responsáveis pela migração de monócitos, linfócitos e células musculares lisas para o espaço subendotelial, onde os monócitos se diferenciam em macrófagos que, por

sua vez, captam a LDL-ox. Os macrófagos, repletos de LDL-ox, são denominados de células espumosas, as quais são responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica mediante a secreção de citocinas pró-inflamatórias, juntamente com a diferenciação dos linfócitos T e enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais, fazendo com que a inflamação, no local da lesão, amplie (HANSSON, 2005; DE CARVALHO et al., 2010; BORISSOFF; SPRONK; TEN CATE, 2011; BRASIL, 2013; CANUEL et al., 2013). O processo de formação de placas ateroscleróticas, e consequente formação do processo inflamatório nas artérias coronárias, pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. (A) Excesso de lipoproteína de baixa densidade (LDL) na corrente sanguínea aumenta a permeabilidade na camada íntima das artérias coronárias, atraindo a migração de monócitos, onde se diferenciam em macrófagos que, por sua vez, captam a LDL oxidada, formando as células espumosas. (B) Os monócitos diferenciados em macrófagos que, por sua vez, formaram as células espumosas, levam à progressão da placa aterosclerótica através da liberação de citocinas, levando à inflamação e danos nos tecidos.



Fonte: Adaptado de Hansson (2005).

Dessa forma, a placa aterosclerótica é formada por um núcleo lipídico, rico em colesterol, e por uma capa fibrosa, rica em colágeno e, de acordo com a distribuição desses elementos, classifica-se as placas ateroscleróticas em estáveis ou instáveis. As placas estáveis apresentam capa fibrosa espessa, núcleo lipídico tênue e atividade inflamatória sutil. Já as placas instáveis são qualificadas por atividade inflamatória intensa, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrosa de baixa espessura (DE CARVALHO et al., 2010; BRASIL, 2013).

A progressão da aterosclerose causa a disfunção mecânica e funcional da artéria, diminuindo o lúmen arterial e comprometendo o fluxo sanguíneo. Além disso, a desestabilização ou ruptura, e/ou erosão, da placa aterosclerótica pode conduzir à formação de trombos, que podem obstruir parcialmente ou totalmente as artérias coronárias, fenômeno conhecido como aterotrombose. A aterotrombose pode levar ao desenvolvimento do infarto do miocárdio, o qual geralmente é a primeira manifestação da DAC, quando o lúmen arterial se encontra reduzido em pelo menos 75%, ou pode ocorrer também, repetidamente, em indivíduos com doença já estabelecida (WHO, 2006; CORRÊ-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007; BORGES, 2009; DE CARVALHO et al., 2010; BORISSOFF; SPRONK; TEN CATE, 2011; THYGESEN et al., 2012; SILVA et al., 2013).

A aterosclerose, de um modo geral, é um processo demorado, que pode levar de 20 a 30 anos desde a formação inicial da placa aterosclerótica até as manifestações clínicas. Desse modo, as doenças cardiovasculares são as principais representantes dos processos patológicos ligados ao envelhecimento, uma vez que acometem principalmente homens com 60 anos, e mulheres entre 60 e 70 anos, aumentando gradativamente com a idade (WHO, 2006; CORRÊ-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007; BORGES, 2009; RAMOS et al., 2009; DE CARVALHO et al., 2010; BORISSOFF; SPRONK; TEN CATE, 2011; THYGESEN et al., 2012; SILVA et al., 2013). Contudo, estudos demonstram uma prevalência excedente a 40% de placas ateroscleróticas em autópsias de adultos jovens, sugerindo que o processo aterosclerótico ocorra também precocemente (MCGILL et al., 2000). Ainda, outros estudos têm relacionado o maior risco de doenças cardiovascular em adolescentes e jovens adultos, devido o alto índice de obesidade e sedentarismos nesses indivíduos (HUDSON et al., 2015; HUGHAN et al., 2015; PARK et al., 2015).

2.4 Fatores de risco

Desde os primeiros relatos de doenças cardiovasculares, pesquisadores vêm detectando diversas condições relacionadas com o desenvolvimento da patologia cardiovascular e, a partir de muitos estudos, identificou-se os denominados fatores de risco, que estão associadas com o desenvolvimento de DCVs (BRASIL, 2001; BRASIL, 2013). Um dos primeiros estudos realizados, que desvendou a relação de alguns fatores de risco com o desenvolvimento de doenças cardíacas, foi o estudo de Framingham (*Framingham Heart Study*), iniciado em 1948, que acompanhou aproximadamente 6.000 pessoas durante anos, estabelecendo os principais fatores de risco associados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (D'AGOSTINO; KANNEL, 1989; WILSON et al., 1998; D'AGOSTINO et al., 2008). Atualmente, sabe-se que a formação da placa aterosclerótica na DAC inicia com a agressão ao endotélio das artérias coronárias, devido a vários fatores de risco, sugerindo que aproximadamente 80% das mortes por doenças cardiovasculares estão associadas a fatores de risco já conhecidos, como os fatores de risco ditos modificáveis, pressão arterial sistêmica, dislipidemias, diabetes mellitus, tabagismo, sedentarismo, gordura abdominal, estresse e os fatores de risco não modificáveis, como gênero, histórico familiar e idade (BRASIL, 2006; LOTUFO, 2008; EYKEN; MORAES, 2009; BORGES; BUSNELLO; PELLANDA, 2012; WHO, 2012; BRASIL, 2013; ANUJUO et al., 2015).

A partir da descoberta dos principais fatores de risco, e de diversos estudos, foram desenvolvidos escores de risco (ER) para o desenvolvimento de doença cardiovascular como, por exemplo, o Escore de Risco de Framingham, o Escore de Risco de Reynolds, o Escore de Risco Global e o Escore de Risco pelo Tempo de Vida. Em conjunto, todos os ER têm como objetivo determinar o risco de um indivíduo desenvolver doenças cardíacas, baseados nos diferentes fatores de riscos, que marcam inúmeras pontuações, para chegar no escore de risco de fato (RIDKER et al., 2007; D'AGOSTINO et al., 2008; BERRY et al., 2012; BRASIL, 2013). Contudo, apesar de estabelecida a influência dos fatores de risco ambientais na predisposição à DAC, sabe-se que esta é uma doença multifatorial, onde há o envolvimento de

fatores genéticos, influenciando também na determinação e progressão da doença (BRASIL, 2013; ROBERTS, 2014; HUSSAIN; IQBAL; JAVED, 2015).

2.4.1 Fatores genéticos

Estudos genéticos com gêmeos e famílias documentam uma herdabilidade de 40-50% para a DAC (ZDRAVKOVIC et al., 2001; ZDRAVKOVIC et al., 2007; PEDEN; FERRALL, 2011) e, devido a isso, muitos esforços têm sido empregados na busca dos genes associados com essa doença. Entre estes esforços, são realizados estudos de ligação, estudos de associação gene candidato e, mais recentemente, estudos de varredura genômica (GWAS, do inglês *genome wide association studies*) (ROBIN et.al., 2007; NDIAYE et al., 2011; BRAUTBAR; POMPEII, 2012).

Primeiramente, a partir de hipóteses biológicas, genes e regiões de interesse são selecionados, como os genes que codificam proteínas envolvidas no processo da aterosclerose e que, portanto, afetam o desenvolvimento da DAC. A partir disso, são realizados diversos tipos de estudos, como estudos de associação gene candidato e estudos com modelos animais. Muitos desses estudos têm evidenciado inúmeros genes envolvidos com a DAC, entre eles o gene do receptor de LDL (*LDLR*), o gene da apolipoproteína-E (*ApoE*), da apolipoproteína-B (*ApoB*), da Proteína C Reativa (*PCR*) e o gene *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*), o qual codifica uma enzima que degrada receptores de LDL, entre outros (SAMANI; SCHUNKERT, 2008; BRAUTBAR et al., 2009; BUYSSCHAERT et al., 2010; SCHUNKERT; ERDMANN; SAMANI, 2010; ROBERTS, 2014; ATANASOVSKA et al., 2015). Ainda, um estudo em larga escala, ao avaliar 63.746 casos de DAC e 130.681 controles, realizou uma análise de rede com 233 genes candidatos, mostrando que a via de sinalização celular com ativação do NFkB (*nuclear factor kappa B*) está intimamente relacionada com o risco da patologia, corroborando o envolvimento do sistema imune e de processos inflamatórios no desenvolvimento de DAC (CARDIOGRAMPLUSC4D CONSORTIUM et al., 2013). A Figura 2 é uma adaptação de uma tabela obtida em um artigo de revisão, a qual apresenta os principais genes candidatos, associados em estudos de

ligação ou associação, envolvido com doenças cardiovasculares (ROBERTS, 2014).

Figura 2. Genes associados com doenças cardiovasculares.

Localização	SNP	Gene	Frequência para o alelo de risco	Oddis Ratio	Ano
Variantes de risco associados com LDL-colesterol					
6q25.3	rs3798220	LPA	0.02 (C)	1.92 (1.48-2.49)	2009
2p24.1	rs515135	APOB	0.83 (G)	1.03	2012
1p13.3	rs599839	SORT1	0.78 (A)	1.29 (1.18-1.40)	2007
19p13.2	rs1122608	LDLR	0.77 (G)	1.14 (1.09-1.19)	2009
19q13.22	rs2075650	APOE	0.14 (G)	1.14 (1.09-1.19)	2011
2p21	rs6544713	ABCG5-ABCG8	0.29 (G)	1.07 (1.04-1.11)	2011
1p32.3	rs11206510	PCSK9	0.82 (T)	1.15 (1.10-1.21)	2009
Variantes de risco associados com HDL-colesterol					
6p21.31	rs12205331	ANKS1A	0.81 (C)	1.04	2012
Variantes de risco associadas com triglicerídeos					
8q24.13	rs10808546	TRIB1	0.65 (A)	1.08 (1.04-1.12)	2011
11q23.3	rs964184	ZNF259, APOA5-A4-C3-A1	0.13 (G)	1.13 (1.10-1.16)	2011
Variente de risco associados com hipertensão					
12q24.12	rs3184504	SH2B3	0.44 (T)	1.13 (1.08-1.18)	2009
10q24.32	rs12413409	CYP17A1, CNNM2, NT5C2	0.89 (G)	1.12 (1.08-1.16)	2011
4q31.1	rs7692387	GUCYA3	0.81 (G)	1.13	2012
16q26.1	rs17514846	FURIN-FES	0.44 (A)	1.04	2012
Variantes de risco associadas com infarto do miocárdio					
9q34.21	rs579459	ABO	0.21 (C)	1.10 (1.07-1.13)	2011
Variantes de risco de mecanismos desconhecidos					
9p21.3	rs4977574	CDKN2A, CDKN2B	0.46 (G)	1.25 (1.18-1.31) e 1.37 (1.261.48)	2007
1p32.2	rs17114036	PPAP2B	0.91 (A)	1.17 (1.13-1.22)	2011
5q31.1	rs2706399	IL5	0.48 (A)	1.02 (1.01-1.03)	2011
6q23.2	rs12190287	TCF21	0.62 (C)	1.08 (1.06-1.10)	2011
1q21	rs4845625	IL6R	0.47 (T)	1.09	2012
6p21	rs10947789	KCNK5	0.76 (T)	1.01	2012

Fonte: Adaptado de Roberts (2014).

No entanto, cabe ressaltar que, apesar da alta herdabilidade para a DAC, e de todos os genes já relacionados com a enfermidade, nenhum dos genes investigados até o momento parece ser suficiente ou necessário para o desenvolvimento da patologia. Além disso, parece que variantes genéticas comuns sozinhas, mesmo que tenham um efeito na doença, ainda não são capazes de explicar toda a variação atribuível aos genes (CARDIOGRAMPLUSC4D CONSORTIUM et al., 2013; ROBERTS, 2014; ATANASOVSKA et al., 2015).

2.5 Sistema Imunológico

O sistema imunológico é um complexo que defende organismos multicelulares de infecções, de tecidos que sofram injúria e de inflamações exarcebadas, através da produção de células capazes de reconhecer e eliminar um determinado agente agressor. Esse complexo é dividido, principalmente, em dois tipos de respostas imunológicas: a resposta imune adaptativa e a resposta imune inata, sendo que ambas parecem mediar a fisiopatologia da DAC (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006; BATISTA; HARWOOD, 2009; CRUVINEL et al., 2010; GASTEIGER; RUDENSKY, 2014; EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; SPITZ et al., 2015; ZHANG; WANG; HE, 2015).

A imunidade adaptativa faz o reconhecimento de antígenos, através dos receptores de antígenos nos linfócitos T (TCR), e de moléculas solúveis por eles produzidas, como, por exemplo, os anticorpos, iniciando a resposta de defesa pelos linfócitos T citotóxicos contra o antígeno. Além disso, ocorre a ativação das células B, as quais produzem anticorpos contra o antígeno, onde o sistema imune se adapta para o reconhecimento e eliminação do antígeno e também se adapta para lembrar do agente invasor, estabelecendo, então, a memória imunológica (HORKKO et al., 2000; HANSSON et al., 2002; SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006; LIBRANDI; PANDOCHI, 2008; CRUVINEL et al., 2010; RUDENSKY, 2014; EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; ROJAS et al., 2015; GASTEIGER SPITZ et al., 2015; ZHANG; WANG; HE, 2015).

Contudo, a imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, a qual inclui, em todos os indivíduos, mecanismos celulares e moleculares, como barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, predispostos antes do contato prévio com o antígeno, detendo o mesmo e eliminando-o através do processo inflamatório. Esta resposta é efetiva e rápida, eliminando o antígeno em poucas horas, normalmente (HORKKO et al., 2000; HANSSON et al., 2002; SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006; LIBRANDI; PANDOCHI, 2008; CRUVINEL et al., 2010; GASTEIGER; RUDENSKY, 2014; EVANS; REPASKY; FISHER, 2015; ROJAS et al., 2015; SPITZ et al., 2015; ZHANG; WANG; HE, 2015).

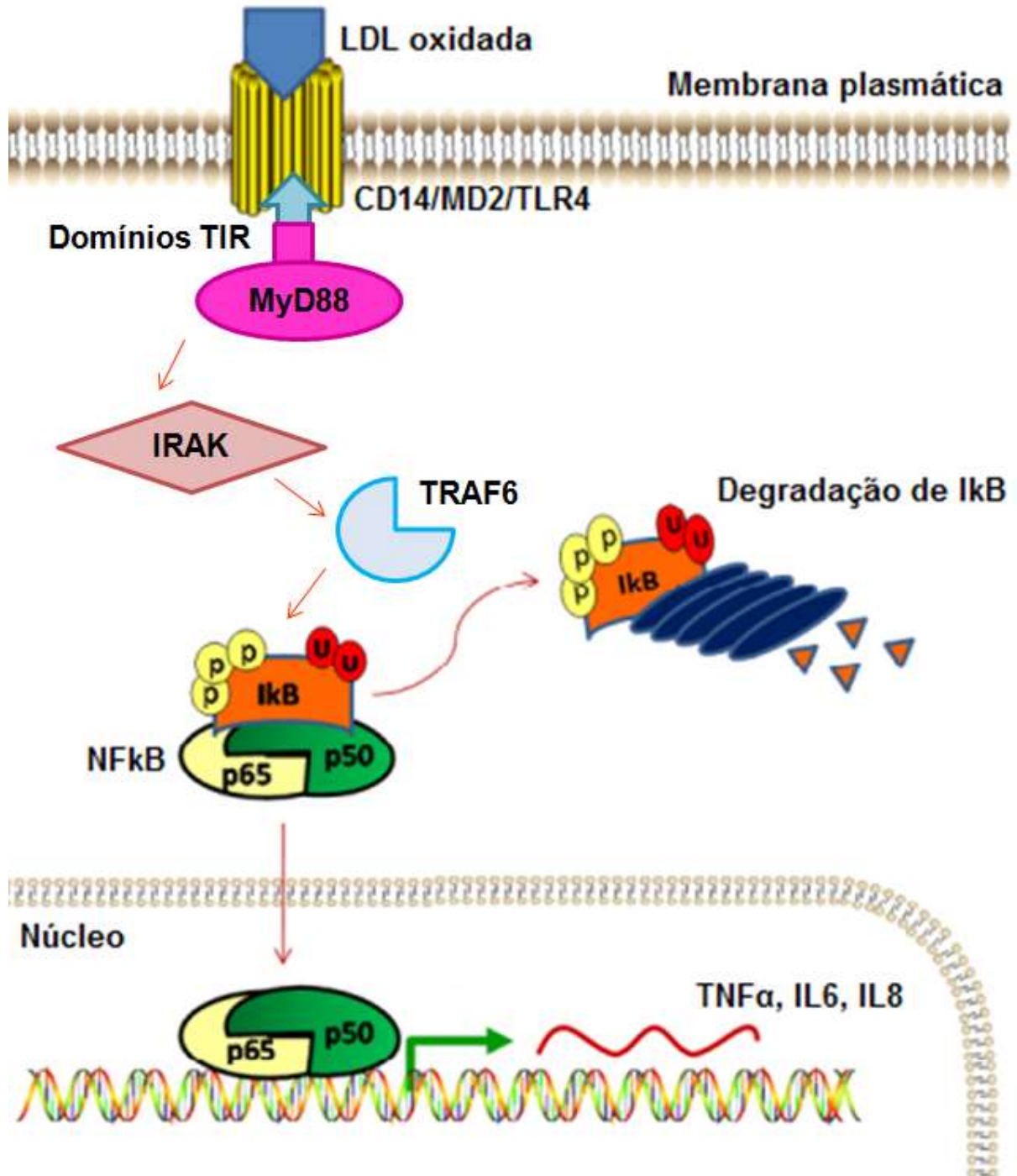
As principais células da imunidade inata que combatem o agente invasor são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células fagocitárias e células *Natural Killer* (NK), através de fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e ativação de proteínas do sistema complemento. Logo, as primeiras células do sistema imune inato identificadas na aterosclerose foram os macrófagos, que são produtores de citocinas pró-inflamatórias (HORKKO et al., 2000; HANSSON et al., 2002; KIECHL et al., 2002; SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006; LIBRANDI; PANDOCHI, 2008; CRUVINEL et al., 2010; ROJAS et al., 2015; SPITZ et al., 2015; ZHANG; WANG; HE, 2015).

O processo de combate ao agente invasor inicia quando o sistema imune inato é ativado, através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como produtos derivados de bactérias patogênicas (lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos), e outros ligantes exógenos e endógenos, como citocinas pró-inflamatórias e LDL-ox, por receptores de reconhecimento de padrões (RRP). Os RRP agem como sensores de reconhecimento aos sinais de perigo, desencadeando uma via de sinalização intracelular que estimula os macrófagos a secretarem citocinas pró-inflamatórias, sendo os RRP mais expressivos o *Toll-Like Receptor* (TLR) e o *scavenger receptor* (SR) (HANSSON et al., 2002; COMPTON et al., 2003; SCHLICHTING; MACCOLLAM, 2007; CALICH et al., 2008; CRUVINEL et al., 2010; MACHADO-CRUZ et al., 2010; FERRAZ et al., 2011; JIA et al., 2014; SHAO et al., 2014; ROJAS et al., 2015; TUNDUP et al., 2015).

A via de sinalização intracelular ativada na DAC, e em outras patologias, como a sepse por exemplo, segue o modelo clássico de cascata, a MyD88 (*Myeloid differentiation protein 88*) dependente, que funciona da seguinte forma: o receptor CD14 (*cluster of differentiation 14*), o qual não possui porção intracelular, ou seja, só possui contato com o citoplasma, reconhece a presença de LDL-ox, acionando então o receptor de membrana TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*), com auxílio da molécula adaptadora MD2. O sinal é traduzido pela interação do domínio TIR (*receptor Toll*), do TLR4, com outro domínio TIR, presente na molécula citoplasmática MyD88 (*Myeloid differentiation protein 88*). O *death-domain* do MyD88 se prende ao *death-domain* de uma serina/treonina kinase à IRAK (*Interleukin-1-receptor-associated kinase*) e se

propaga via TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*), que sofre fosforilação. O TRAF6 induz a fosforilação e poliubiquitinação da I κ B (Proteína inibitória da família de proteínas Rel), que, por consequência, é degradada, liberando o principal regulador de inflamação, o NF κ B. O NF κ B é translocado para o núcleo da célula, onde aciona os genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como o *TNF α* e as interleucinas (IL) IL-1, IL-8, IL-12 e IL-6. Dessa forma, o CD14, o TLR4 e NF κ B estão, portanto, entre as principais proteínas envolvidas nas condições inflamatórias através da via de sinalização intracelular do sistema imune inato. Porém, se essa sinalização ocorrer de forma incorreta, o processo inflamatório pode estar exacerbado, levando ao desenvolvimento de DAC e de outras patologias, indicando a importância dos estudos de genes envolvidos na via de sinalização intracelular (GLEZERA et al., 2000; COMPTON et al., 2003; FRANTZ, ERTL, BAUERSACHS, 2007; CALICH et al., 2008; MACHADO-CRUZ et al., 2010; FERRAZ et al., 2011; LIMA-NETO et al., 2012; BOVIJN et al., 2013; LI; YIN; WU, 2013; JIA et al., 2014; CHENG et al., 2015; TUNDUP et al., 2015). A Figura 3 representa a via de sinalização intracelular desencadeada pela presença de LDL-ox.

Figura 3. Mecanismo de desencadeamento do processo da resposta imune inata provocado pela presença de LDL oxidada (LDL-ox), nas seguintes ligações e ativações: LDL-ox→ CD14→ MD2→ TLR4→ NFκB→ citocinas pró-inflamatórias.



Fonte: Adaptado de Cecon (2010).

2.5.1 CD14

O CD14 (*cluster of differentiation 14*) é um RRP, que identifica PAMPs, como os lipopolissacarídeos, gerado por bactérias gram-negativas, e outros ligantes exógenos e endógenos, como citocinas pró-inflamatórias e LDL-ox, em células mielóides (monócitos, macrófagos e neutrófilos), bem como em células não-mielóides (endotelial e epitelial). Este receptor tem um papel importante na defesa do organismo, através da imunidade inata, onde monócitos, células endoteliais e células do músculo liso são ativadas, e na regulação do processo apoptótico (STELTER, 2000; BJÖRKBACKA et al., 2004; ARROYO-ESPLIGUERO et al., 2005; NAKADA et al., 2005; VAINAS et al., 2006; MACHADO-CRUZ et al., 2010; TAKEDA; 2010; LIMA-NETO et al., 2012; XU; WANG, 2013; TUNDUP et al., 2015).

O CD14 é uma glicoproteína de 55 KDa que pode ser encontrada de duas formas, fixa na membrana de células do sistema imune (mCD14) ou livre no soro (sCD14). O CD14 solúvel (sCD14), que procede da secreção direta de CD14 ao meio extracelular ou da proteólise do mCD14, desempenha um papel crucial em células que não expressam mCD14, permitindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (UNKELBACH et al., 1999; STELTER, 2000; MORANGE et al., 2004; MACHADO-CRUZ et al., 2010; TAKEDA; 2010; KIM et al., 2012; LIMA-NETO et al., 2012; XU; WANG, 2013). Contudo, o CD14 não é uma proteína transmembrânica, pois não possui conexão com o citoplasma celular e, consequentemente, não pode ativar a resposta imune isoladamente. Dessa forma, a tradução dos sinais ocorre através de quinases intracelulares, proteína G, fosfolipases e, principalmente, por receptores TLRs acoplados a uma molécula adaptadora MD2 (UNKELBACH et al., 1999; MORANGE et al., 2004; ARROYO-ESPLIGUERO et al., 2005; VAINAS et al., 2006; MACHADO-CRUZ et al., 2010; LIMA-NETO et al., 2012; XU; WANG, 2013; TUNDUP et al., 2015).

Inúmeros estudos demonstram que o aumento na expressão de CD14 desencadeia diversas patologias inflamatórias e imunológicas, entre elas o câncer gástrico, sepse, herpes, colite ulcerosa, doença de Crohn e doenças cardiovasculares (HUBACEK et al., 1999; COMPTON et al., 2003; NAKADA et al., 2005; VAINAS et al.,

2006; HOLD et al., 2009; KIM et al., 2012). Uma pesquisa realizada por Tapp e coautores (2013), que teve como objetivo avaliar a expressão do *TLR4* e de seus receptores nos monócitos, entre eles o *CD14*, em 40 indivíduos com DAC e 98 indivíduos que sofreram infarto do miocárdio, demonstrou um aumento na expressão do *CD14* nos indivíduos que sofreram infarto, quando comparados com o grupo de indivíduos com DAC.

2.5.1.1 Gene *CD14*

O gene *CD14* localiza-se na região cromossômica 5q31.1, sendo constituído por três éxons, que codificam uma proteína de 375 aminoácidos (HUBACEK et al., 1999; XU; WANG, 2013; LI Y et al., 2015). Um dos polimorfismos mais estudados no gene *CD14*, que está comumente associado com os níveis de expressão do gene, levando a alterações na resposta inflamatória, é o polimorfismo rs2569190, também denominado como -260C/T ou -159C/T. Esse polimorfismo está localizado na região promotora do gene, próximo ao local de reconhecimento do fator de transcrição Sp1, o que pode estar relacionado com a capacidade de transcrição do gene. Dessa forma, sugere-se que portadores do genótipo TT, para o polimorfismo rs2569190, apresentam aumento nas concentrações do CD14 de membrana (mCD14), devido à alteração na região promotora (HUBACEK et al., 1999; NAUCK et al., 2002; ENG et al., 2003; MORANGE et al., 2004; ARROYO-ESPLIGUERO et al., 2005; BERNARDO et al., 2006; VAINAS et al., 2006; HOLD et al., 2009; ERTAN et al., 2011; XU; KIM et al., 2012; WANG, 2013; RAJASURIAR et al., 2015).

Vários estudos demonstram que o polimorfismo rs2569190 está associado com a aterosclerose, DAC e infarto do miocárdio (SHIMADA et al., 2000; ZEE; BATES; RIDHER et al., 2002; NAUCK et al., 2002; ARROYO-ESPLIGUERO et al., 2005; BERNARDO et al., 2006; VAINAS et al., 2006). Li Y e colaboradores (2015) realizaram uma meta-análise, que incluiu sete estudos individuais, totalizando 4.467 indivíduos. Os achados evidenciaram que portadores do alelo T, para o polimorfismo rs2569190, estão mais predispostos à DAC, principalmente na população chinesa. A

Tabela 1 apresenta os estudos de associações entre o polimorfismo em questão e as doenças cardiovasculares.

Tabela 1. Estudos de associações entre o polimorfismo rs2569190 do gene *CD14* com fenótipos relacionados a doenças cardiovasculares.

Tamanho amostral	Etnia	Fenótipos avaliados	Principais resultados	Referências
333	Japoneses	Doença arterial coronariana	Associação do genótipo TT com a doença arterial coronariana	KONDO et al., 2003
856	Ingleses	Síndrome coronária aguda (SCA)	Genótipo TT é um fator de risco para a SCA	ARROYO-ESPLIGUERO et al., 2005
82	Espanhóis	Doença arterial coronariana	Genótipo TT está associado com maior risco de doença arterial coronariana	BERNARDO et al., 2006
380	Chineses	Doença arterial coronariana	Associação do genótipo TT com maior susceptibilidade de doença arterial coronariana	LIU; YANG, 2010
665	Tunisianos	Infarto do miocárdio	Não encontrou-se associação significativa do genótipo TT com IM	SEDIRI et al., 2011
210	Brasileiros	Infarto do miocárdio	Portadores do genótipo TT apresentam um perfil pró-aterogênico	LIMA-NETO et al., 2013

Fonte: Da autora (2016).

2.5.2 TLR4

Os TLR são receptores de reconhecimento de padrões, ou seja, proteínas transmembrânicas, conservadas evolutivamente em macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B. A principal função é o reconhecimento de agentes patogênicos, como proteínas de choque térmico, LDL-ox e lipolissacarídeos, para eliminação dos mesmos, através da indução de uma cascata de sinais que leva ao processo

inflamatório (EDFELDT et al., 2002; VAINAS et al., 2006; FRANTZ; ERTL; BAUERSACHS, 2007; ERRIDGE, 2010; FERRAZ et al., 2011; KIM et al., 2012; LIMA-NETO et al., 2012; LIU et al., 2012; SPIRING; TSUI; SHAW, 2012; GOLOVKIN et al., 2014; JIA et al., 2014; SHAO et al., 2014; FENG et al., 2015).

A proteína Toll foi primeiramente identificada em insetos do gênero *Drosophila*, nos quais exerce efeitos protetores contra infecções fúngicas. Posteriormente, em 1997, foi descoberta em humanos, recebendo o nome de *Toll-Like receptor* e classificada em 10 tipos (TLR1 a 10) (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; AKIRA, 2006; FRANTZ; ERTL; BAUERSACHS, 2007; FERRAZ et al., 2011; SPIRING; TSUI; SHAW, 2012; FENG et al., 2015).

O domínio extracelular do TLR, rico em leucinas, é quem interage com o receptor CD14, permitindo o reconhecimento do agente invasor. Já o domínio citoplasmático é chamado de receptor Toll-interleucina-1 (*Toll interleucine receptor*; TIR), o qual é imprescindível para o início da cascata de sinalização para produção de citocinas pró-inflamatórias (SCHORODER et al., 2005; AKIRA, 2006; FRANTZ, ERTL, BAUERSACHS, 2007; FERRAZ et al., 2011; SPIRING; TSUI; SHAW, 2012; BOVIJN et al., 2013).

O primeiro TLR descrito em mamíferos foi o TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*), o qual está presente na membrana plasmática das células e, através de sua ligação ao receptor CD14, com auxílio da molécula adaptadora MD2, reconhece o agente invasor e ativa a via de sinalização pela ligação do domínio TIR com o domínio TIR da molécula MyD88. Essa molécula emite sinais para a produção de citocinas pró-inflamatórias, que levam a diversas patologias, como doença periodontal crônica, sepse, asma, bronquiolite severa, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, câncer e doenças cardiovasculares (EDFELDT et al., 2002; BARBER et al., 2004; EDFELDT et al., 2004; DAHMER et al., 2005; SCHORODER et al., 2005; VAINAS et al., 2006; FRANTZ, ERTL, BAUERSACHS, 2007; PEETERS et al., 2007; SPIRING; TSUI; SHAW, 2012; JIA et al., 2014; AO et al., 2015; FENG et al., 2015; SCHENEIDER et al., 2015; SHENG et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Shao e colaboradores (2014) examinaram a associação entre a expressão de TLR3 e TLR4, de monócitos da via de sinalização de citocinas pró-inflamatórias, com

diferentes graus de aterosclerose, na DAC. O estudo avaliou 36 indivíduos, com apenas um vaso sanguíneo obstruído, 36 indivíduos com dois vasos obstruídos, 36 indivíduos com três vasos obstruídos e 33 indivíduos saudáveis (controles sem obstrução de vasos). Os achados indicam que a expressão do RNA mensageiro (RNAm) do gene *TLR4* foi significativamente aumentada em indivíduos com DAC, em comparação ao grupo controle, e, ainda, os níveis foram correlacionados positivamente com o grau de aterosclerose. Não o bastante, um estudo recente avaliou os níveis de microRNAs (miRNA), já relacionados com a DAC na literatura, em relação aos níveis de proteína TLR4, em indivíduos com DAC e sem DAC. Os autores relatam uma associação entre a baixa expressão desses miRNAs com o aumento nos níveis da proteína TLR4, em indivíduos com DAC (LI et al., 2014).

2.5.2.1 Gene *TLR4*

O gene *TLR4* está localizado na região cromossômica 9q33.1, contendo 4 éxons (ROCK et al., 1998; SHENG et al., 2015). Esse gene possui inúmeros polimorfismos descritos e, entre eles, destacam-se dois polimorfismos funcionais que estão localizados no éxon 3 do gene, sendo eles: o rs4986790 (896A/G; Arg299Gly), que consiste na troca de um aminoácido ácido aspártico por uma glicina no códon 299, e o polimorfismo rs4986791 (1196C/T; Thr399Ile), que troca o aminoácido treonina por uma isoleucina no códon 399 (NAKADA et al., 2005; VAINAS et al., 2006; FRANTZ, ERTL, BAUERSACHS, 2007; LABRUM et al., 2007; LIMA-NETO et al., 2012; GUVEN et al., 2015; SCHENEIDER et al., 2015; SCHENEIDER; KOCH et al., 2015). Essa troca de aminoácidos afeta o domínio extracelular do receptor TLR4 que atenua a resposta inflamatória quando o receptor reconhece os agentes agressores (ARBOUR et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2015).

O papel dos polimorfismos rs4986790 e rs4986791 têm sido inconsistentes na literatura, uma vez que alguns estudos de associação desses polimorfismos com as doenças cardiovasculares relatam que essas variações genéticas estão associadas com um maior risco de desenvolvimento de DAC (YANG; HOLLOWAY; YE, 2003;

EDFELT et al., 2004; VAINAS et al., 2006). Enquanto que outras análises demonstram que os polimorfismos diminuem o risco dessa patologia (KIECHL et al., 2002; BOEKHOLDT et al., 2003; SALES et al., 2010) ou, ainda, que não estão associados com a doença (BEIJK et al., 2010; ZHANG et al., 2012; YIN et al., 2014).

Vainas e colaboradores (2006) avaliaram a associação entre os polimorfismos rs4986790, do gene *TLR4*, e rs2569190, do gene *CD14*, com a extensão da aterosclerose, em 607 indivíduos Holandeses, com doença arterial periférica (PAD). Os achados revelaram que o genótipo TT, do polimorfismo do gene *CD14*, quando associado ao genótipo GG, do polimorfismo do gene *TLR4*, está associado com uma maior extensão da aterosclerose, o que demonstra que a interação entre as variáveis genéticas pode influenciar no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. A Tabela 2 apresenta os estudos de associação dos polimorfismos rs4986790 e rs4986791 com as doenças cardiovasculares.

Tabela 2. Estudos de associações entre os polimorfismos rs4986790 e rs4986791, do gene *TLR4*, com fenótipos relacionados a doenças cardiovasculares.

Polimorfismos	Tamanho amostral	Etnia	Fenótipos avaliados	Principais resultados	Referências
rs4986790 e rs49867901	810	Italianos	Aterosclerose	Genótipo GG, do polimorfismo rs4986790, está associado com menor risco de aterosclerose	KIECHL et al., 2002
rs4986790	183	Europeus	Doença arterial coronariana	Associação do genótipo GG com menor risco doença arterial coronariana	AMEZIANE et al., 2003
rs4986790	210	Ingleses	Infarto do miocárdio	Associação do genótipo GG com menor risco de IM	HOLLOWAY; YANG; YE., 2005
rs4986790	443	Brasileiros	Hipertrofia ventricular esquerda (HVE)	Genótipo GG apresenta menor prevalência de HVE	SALES et al., 2010
rs4986790	360	Croatas	Aterosclerose e IM	Associação do genótipo GG com menor susceptibilidade a aterosclerose e IM	DŽUMHUR et al., 2012
rs4986790 e rs49867901	269	Australianos	Arterite de células gigantes (ACG)	Não foi identificada associação dos polimorfismos com a ACG	DUNSTAN et al., 2014
rs4986790	292	Russos	Doença arterial coronariana	Associação do genótipo AG com a DAC	KUTIKHIN et al., 2016
rs4986790	4.552	Chineses	Isquemia cerebrovascular	Não foi detectada associação	YIN et al., 2014

Fonte: Da autora (2016).

2.5.3 NFκB

O NFκB (*Nuclear factor kappa B*) é o fator de transcrição central da inflamação, pois regula a expressão de aproximadamente 200 genes envolvidos no processo inflamatório, entre citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão celular, sendo fundamental para o sistema imune inato (GLEZERA et al., 2000; MACHADO-CRUZ et al., 2010; BOCCARDI et al., 2011; LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2012; BANK et al., 2014; SALIM; XAVIER; 2014). Esse fator de transcrição está localizado no citoplasma das células imunes, ligado a uma proteína inibidora, a IκB. Quando ativada a via de sinalização celular CD14/TLR4/MyD88, pela presença de LDL-ox, no caso da DAC, ocorre a fosforilação e ubiquitinação e consequente degradação, por proteossomas, da IκB. Essa degradação permite a translocação do NFκB para o núcleo, onde sofre dimerização e ativa diferentes genes. Essa ativação ocorre devido à ligação do NFκB a regiões regulatórias (GGGRNNYYCC), onde R é uma base purina, N pode ser qualquer base e Y é uma base pirimidina, presentes na região promotora dos genes alvos (GLEZERA et al., 2000; MACHADO-CRUZ et al., 2010; BOCCARDI et al., 2011; LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2012; MISHRA et al., 2013; BANK et al., 2014; SALIM; XAVIER; 2014).

Em mamíferos, são encontrados cinco membros da família de proteínas NFκB, caracterizadas por possuírem domínios REL (RHD), o qual é responsável pela dimerização, ligação do NFκB ao DNA e ligação ao IκB. Os cinco membros são: RELA (p65), RELB, REL (c-Rel), NFκB1 (p50) e NFκB2 (p52), onde os dois últimos são subunidades de precursores maiores, o p105 e p100 respectivamente (KARBAN et al., 2004; MACHADO-CRUZ et al., 2010; SANTOS et al., 2010; BOCCARDI et al., 2011; VOGEL et al., 2011; LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2012; SALIM; XAVIER; 2014; YANG et al., 2014; LI et al., 2015).

Sabe-se que diferentes tipos de combinações dos dímeros, formando homodímeros ou heterodímeros, da família de proteínas do NFκB, são capazes de ativar diferentes genes ou, ainda, bloquear a transcrição do NFκB. Entretanto, o heterodímero p65/p50 é o mais frequente. As subunidades RELA, RELB e c-Rel são conhecidas como subunidades ativadoras de transcrição gênica, devido a presença

de um domínio de transativação (TAD) na sua porção C-terminal. Já as subunidades p50 (NFKB1) e p52 (NFKB2) são inibitórias da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , pois ligam-se nas regiões promotoras desses genes, bloqueando a interação com o heterodímero p65/p50 do NF κ B (GLEZERA et al., 2000; KARBAN et al., 2004; HAYDE; GHOSH, 2008; MACHADO-CRUZ et al., 2010; SANTOS et al., 2010; BOCCARDI et al., 2011; VOGEL et al., 2011; LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2012; SALIM; XAVIER; 2014; YANG et al., 2014; LI et al., 2015).

Dessa forma, a ativação inadequada do NF κ B é um fator importante para o desenvolvimento de diversas patologias inflamatórias e autoimunes. Dentre as patologias, podemos citar asma, aterosclerose, infarto do miocárdio, DAC, acidente vascular cerebral, hipertensão, diabetes mellitus, osteosarcoma, câncer de pulmão, câncer de mama, doença de Crohn, artrite reumatóide, lúpus eritematoso, entre outras (CURRAN; WEINSTEIN; GRIFFITHS, 2002; PODOLSKY, 2002; ROMZOVA et al., 2006; ZHOU et al., 2009; BOCCARDI et al., 2011; VOGEL et al., 2011; SHIELS et al., 2012; MOHD et al., 2013; BANK et al., 2014; SALIM; XAVIER; 2014; YANG et al., 2014; LI et al., 2015; LI Y et al., 2015).

Diversos estudos relacionam o envolvimento do NF κ B com o desenvolvimento de aterosclerose e de DAC (BRAND et al., 1997; RITCHIE; 1998; LIMA; COUTO; 2006; ZHOU et al., 2009; VOGEL et al., 2011; YANG et al., 2014). Os estudos que avaliam os níveis de expressão do NF κ B demonstraram que o alto nível, principalmente do gene *NFKB1*, está relacionado a DAC (NERI et al., 2013; NAIR et al., 2014).

2.5.3.1 Gene *NFKB1*

O gene *NFKB1* está localizado na região cromossômica 4q24, e é composto por 26 éxons e íntrons. O gene codifica as subunidades p105 em p50 do NF κ B por *splicing* alternativo, onde a subunidade p50 está envolvida na repressão da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α e IL-12, e estimulação da transcrição de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, mostrando que o gene está

especificamente ligado a efeitos anti-inflamatórios (KARBAN et al., 2004; BOCCARDI et al., 2011; VOGEL et al., 2011; LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2012; MISHRA et al., 2013).

Um polimorfismo funcional localizado na região promotora do gene *NFKB1*, que consiste na inserção ou deleção de 4 pares de base (pb) (rs28362491; -94 ins/del ATTG), tem sido relacionado com os níveis de transcrição do gene. O genótipo deleção/deleção (del/del) resulta na redução, ou destruição dos sítios de ligação do fator de transcrição, que reduz consideravelmente a expressão do gene. Dessa forma, com a baixa expressão do gene, os níveis da subunidade p50 diminuem e, consequentemente, a p50 não exerce seu efeito anti-inflamatório, o que justifica a associação do polimorfismo com várias doenças inflamatórias e autoimunes, como colite ulcerosa, osteosarcoma e DAC (KARBAN et al., 2004; SUN; ZHANG, 2007; ZHOU et al., 2009; BOCCARDI et al., 2011; SANTOS et al., 2010; LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2012, MISHRA et al., 2013; YANG et al., 2014).

Vogel e colaboradores (2011) avaliaram a associação do polimorfismo -94 ins/del ATTG com o risco de DAC, em três populações caucasoides distintas. O estudo demonstrou que portadores do genótipo del/del, em todas as populações, apresentam maior risco de desenvolvimento da doença. Ainda, diversos outros estudos demonstram a associação do polimorfismo com a DAC, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Estudos de associações entre o polimorfismo rs28362491, do gene *NFKB1*, com fenótipos relacionados a doenças cardiovasculares.

Tamanho amostral	Etnia	Fenótipo avaliado	Principais resultados	Referências
380	Chineses	Miocardiopatia dilatada	Associação do genótipo del/del com maior risco de miocardiopatia dilatada	ZHOU et al., 2009
1.409	Americanos e Brasileiros	Insuficiência cardíaca	Início precoce da doença em indivíduos com genótipo del/del	SANTOS et al., 2010
830	Indianos	Disfunção ventricular esquerda na doença arterial coronariana	Genótipo del/del modula o risco de insuficiência cardíaca, aumentando a remodelação ventricular	MISHRA et al., 2013
2.042	Chineses	Doença arterial coronariana	Genótipo del/del pode ser considerado um marcador para a doença arterial coronariana	YANG et al., 2014
2.020	Chineses	Doença arterial coronariana	Associação do genótipo del/del com maior susceptibilidade de doença arterial coronariana	LAI et al., 2015

Fonte: Da autora (2016).

2.6 Processo Inflamatório

O processo inflamatório é uma resposta de defesa do organismo a um determinado agente agressor, como, por exemplo, a LDL-ox, ou um agente infeccioso, como bactérias e vírus, em tecidos que sofreram injúria. Normalmente, a inflamação aumenta a migração celular no local de lesão, diminuindo no momento em que o reparo tecidual é concluído. Contudo, se este processo for exacerbado, ou seja, houver uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias, a inflamação pode ser muitas vezes danosa ao organismo (NETHAN, 2002; GERALDO; ALFENAS, 2008; SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010; GÓMEZ et al., 2015; LACKEY; OLEFSKY, 2015).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares solúveis, de baixo peso molecular, de aproximadamente 8 e 30 kDa. São produzidas no local de

lesão a diferentes estímulos, por diversos tipos celulares, mas, principalmente, por células do sistema imunológico, como células dendríticas e macrófagos, podendo atuar como mediadoras da duração e da intensidade da resposta imune e inflamatória, através da ligação a receptores específicos. Essas moléculas atuam principalmente por mecanismo parácrino (comunicação com células vizinhas) e autócrino (comunicação com suas próprias células), além de possuírem característica pleiotrópica, onde uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, e diversas células podem produzir uma mesma citocina, e características redundantes, onde uma mesma citocina possui diferentes funções (TIZARD, 2009; DE OLIVEIRA, 2011).

A regulação do processo inflamatório se dá pelo aumento da inflamação pelas citocinas pró-inflamatórias e pela diminuição da atividade através das citocinas anti-inflamatórias. Dentre as citocinas consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas 1, 2, 6, 7 e TNF α e, entre as anti-inflamatórias, encontramos as IL-4, IL-10 e IL-13 (DE OLIVEIRA, 2011).

A reação inflamatória, caracterizada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, juntamente com a resposta imunológica induzidas pelo acúmulo de LDL na parede das artérias coronárias, tem um papel fundamental no aparecimento e progressão da DAC. O padrão e a magnitude da liberação de citocina no local da lesão do tecido são considerados um determinante crítico da gravidade e da duração da resposta inflamatória. Dessa forma, as citocinas pró-inflamatórias se mostram alvos potenciais como preditores para o desenvolvimento de DAC, já que exercem um papel essencial na indução da resposta de defesa do sistema imune inato (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007; BORISSOFF; SPRONK; TEN CATE, 2011; LIMA-NETO et al., 2012; ELLISON et al., 2013; HUSSAIN; IQBAL; JAVED, 2015).

2.6.1 TNF α

Frequentemente chamado de fator de necrose tumoral, o TNF α pode ser denominado também como TNF. O TNF α é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, solúvel em sua forma ativa com 17kDa, secretada predominantemente por monócitos e macrófagos, sendo considerado o primeiro mediador inflamatório do sistema imune inato em resposta às infecções (ULLOA; TRACEY, 2005; VOLP et al., 2008; MACHADO-CRUZ et al., 2010; DE OLIVEIRA, 2011; QUI et al., 2015). O TNF α é capaz de induzir a produção de radicais de oxigênio e a transdução de sinal, além de ser responsável por ativar monócitos, neutrófilos e células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, promovendo a ligação dos leucócitos ao endotélio no sítio da inflamação, promovendo efeitos sobre o metabolismo lipídico, coagulação, resistência à insulina e função endotelial (ULLOA; TRACEY, 2005; CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007; DE OLIVEIRA, 2011; CUI et al., 2012; QUI et al., 2015).

O aumento local de TNF α é responsável pelos sinais cardeais da inflamação, como, tumor, calor, dor e rubor. Porém, a liberação progressiva do TNF α é deletéria para o organismo, devido a desregulação do sistema imune, amplificação e prolongação da inflamação, ativação de fatores de transcrição responsáveis pelo estresse, como o NFkB e AP-1 (*activator protein 1*), além de indução de apoptose (morte programada) em algumas células (ULLOA; TRACEY, 2005; TIZARD, 2009; DE OLIVEIRA, 2011; CUI et al., 2012; QUI et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que níveis elevados de marcadores inflamatórios, como a PCR e o TNF α , estão associados a aterosclerose e a DAC, pois as citocinas inflamatórias geradas na parede do endotélio das artérias ampliam a captação de LDL-ox, ativando a disfunção endotelial (HANSSON, 2005; VOLP et al., 2008; LOPEZ et al, 2009; CUI et al., 2012; PAPADIMITRIOU; KALOGEROPOULOS, 2015). Al Shahi e colaboradores (2015) também avaliaram os níveis séricos de citocinas inflamatórias e quimiocinas, nas células mononucleares do sangue periférico, de 20 indivíduos com a síndrome coronariana aguda (SCA) e 50 indivíduos com DAC, em uma população japonesa. O estudo demonstrou que a expressão do TNF α foi significativamente

maior no grupo de indivíduos com SCA, em relação ao grupo de indivíduos com DAC. Um outro estudo, que incluiu 96 homens saudáveis da população europeia, com aproximadamente 50 anos de idade, investigou se os níveis de TNF- α estariam relacionados com indicadores de risco cardiovascular, como pressão arterial, colesterol total, HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade), LDL-colesterol e triglicerídeos, ou com a presença de aterosclerose em artérias carótidas, avaliadas através de ultrassom. Os resultados demonstram uma associação significativa entre a presença de aterosclerose e os níveis plasmáticos de TNF α (SKOOG; DICHTL; BOQUIST, 2002).

2.6.1.1 Gene *TNF α*

O gene *TNF α* possui quatro éxons, codifica a citocina pró-inflamatória TNF α , e está localizado região cromossômica 6p21.3, onde está localizada também a região principal do complexo de histocompatibilidade (MHC). O gene apresenta diversos polimorfismos genéticos, sendo os mais estudados as variantes rs1800629 (-308G/A) e rs361525 (-238G/A), que estão situadas na região promotora do gene e associadas com níveis aumentados de transcrição do gene (ALLEN et al., 2001; GROHE STUBER; BOOK, 2006; CUI et al., 2012; CHO et al., 2013; ESKANDARI-NASAB; MOGHADAMPOUR; SEPANJ-NIA, 2015; HUSSAIN; IQBAL; JAVED, 2015; MIRHAFEZ et al., 2015).

Os polimorfismos rs1800629 e rs361525 são comumente relacionados com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GHADERIAN; AKBARZADEH NAJAR; TABATATABAEI PANAH, 2010; CUI et al., 2012; CHO et al., 2013; GIALAFOS et al., 2014; LIAQUAT et al., 2014). Uma meta-análise avaliou o efeito da variante rs1800629 na DAC, incluindo na análise 24 estudos, totalizando 9.921 casos e 944 controles. Os achados demonstraram que o alelo A do polimorfismo está associado com o risco de DAC em caucasianos, mas não nas demais etnias (ZHANG et al., 2011). A Tabela 4 apresenta os estudos de associações entre as variantes no gene *TNF α* e as doenças cardiovasculares.

Tabela 4. Estudos de associações entre os polimorfismos rs1800629 e rs361525, do gene *TNF α* com fenótipos relacionados a doenças cardiovasculares.

Polimorfismo	Tamanho amostral	Etnia	Fenótipos avaliados	Principais resultados	Referências
rs1800629 e rs361525	4.197	Chineses	Acidente vascular cerebral (AVC)	Associação do genótipo AA, em ambos os polimorfismos, com maior susceptibilidade de AVC	CUI et al., 2012
rs361525	601	Coreanos	Doença arterial coronariana	Associação do genótipo AA com maior risco doença arterial coronariana	CHO et al., 2013
rs1800629 e rs361525	173	Gregos	Sarcoidose cardíaca	Associação do genótipo AA, em ambos os polimorfismos, com maior acometimento cardíaco	GIALAFOS et al., 2014
rs1800629	550	Paquistaneses	Cardiomiopatia dilatada idiopática	Associação do genótipo AA com Cardiomiopatia dilatada idiopática	LIAQUAT et al., 2014
rs1800629 e rs361525	300	Paquistaneses	Doença arterial coronariana	Genótipo AA do polimorfismo rs1800629 apresenta maior risco de DAC	HUSSAIN; IQBAL; JAVED, 2015

Fonte: Da autora (2016).

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Amostra

A amostra foi constituída por 707 indivíduos, euro-derivados, de ambos os gêneros, maiores de 18 anos, que realizaram exame de cateterismo cardíaco no Centro de Hemodinâmica do Hospital Bruno Born em Lajeado, RS, no período de julho de 2012 a dezembro de 2013. Todos os indivíduos participantes do estudo foram encaminhados ao serviço por profissionais da área médica, via Sistema Único de Saúde (SUS) ou convênio particular, com as seguintes condições relatadas: angina pectoris (aproximadamente 70% dos indivíduos), falta de ar, alterações de eletrocardiograma e alteração de exames laboratoriais. Foram excluídos do estudo aqueles que estavam inconscientes no momento de realização do exame e os que não tiveram discernimento do que estava sendo proposto na pesquisa. Todos os indivíduos incluídos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO 1).

3.2 Coleta de dados

Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o TCLE e foram submetidos a um questionário semiestruturado (ANEXO 2), que incluiu dados

demográficos, história médica, histórico de doença cardiovascular na família, uso de medicações, consumo de álcool, tabaco e prática de atividades físicas. Foram coletados os dados antropométricos peso e altura, para cálculo do índice de massa corporal (IMC), além da circunferência da cintura.

Durante a realização do exame de cateterismo, foi realizada a aferição da pressão arterial sistólica e diastólica. Foram também coletadas, pelos enfermeiros responsáveis do centro de hemodinâmica, amostras de sangue periférico, para extração de DNA (4mL em tubo com anticoagulante EDTA) e para análises bioquímicas (6mL em tubo com gel separador).

O diagnóstico de DAC em todos participantes do estudo foi estabelecido através da avaliação dos laudos dos exames de cateterismo, realizado pelo médico cardiologista responsável pelo centro de hemodinâmica. O critério utilizado para a definição dos casos de DAC foi a presença de lesões com comprometimento maior ou igual a 50%, em pelo menos uma das artérias coronárias. Os indivíduos que apresentaram lesões com comprometimento inferior ou igual a 30%, ou que não apresentaram sinais de lesões, foram classificados como controles, sendo excluídos os indivíduos com lesões de comprometimento entre 31% e 49%.

3.3 Análises Laboratoriais

3.3.1 Análises Bioquímicas

Os níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, glicose, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), creatinoquinase (CK), creatinoquinase fração MB (CK MB), ureia e PCR Ultrasensível (Proteína C Reativa) das amostras foram determinados utilizando kits comerciais da marca BioClin®. As dosagens foram realizadas na automação de bioquímica BS-120 da Mindray®, no laboratório de análises clínicas do Centro Universitário UNIVATES. O controle de qualidade foi realizado utilizando controles

comerciais normais e patológicos da marca BioClin®. Os indivíduos estavam em jejum de 12 horas. A concentração da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi estimada através da Equação de Friedewald: $CT - HDL - (TG/5)$.

3.3.2 Extração de DNA

O DNA genômico dos leucócitos, em sangue total, foi extraído pelo método de *salting out*, através de uma adaptação do protocolo descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). Após a extração, as amostras foram quantificadas utilizando espectrofotometria de densidade óptica, no aparelho L-Quant®. Posteriormente, as amostras foram diluídas, para uma concentração final de 20ng/μL de DNA, e estocadas em freezer a 20 graus negativos.

3.3.3 Análise genética

As amplificações e genotipagens das amostras para os polimorfismos rs2569190 (*CD14*), rs4986790 (*TLR4*), rs4986791 (*TLR4*), rs1800629 (*TNFα*) e -rs361525 (*TNFα*) foram realizadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), com a tecnologia de discriminação alélica TaqMan®, em um aparelho StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems), disponível no laboratório de biologia molecular do Centro Universitário UNIVATES.

O polimorfismo rs28362491, no gene *NFKB1*, foi amplificado através da técnica convencional de PCR, utilizando a sequência de primers descritas por Li e colaboradores (2015) (forward 5'-TGG GCA CAA GTC GTT TAT GA-3' e reverse 5'-CTG GAG CCG GTA GGG AAG-3'). A genotipagem foi realizada pelo método de RFLP (Restriction Fragment Length *Polymorphisms*), que consiste na digestão enzimática, pela enzima de restrição *PfIMI* (*Van91I*), dos fragmentos de inserção. Posteriormente, foi realizada a separação dos fragmentos por eletroforese, em gel de

agarose 2,5%, onde o alelo de deleção foi identificado por uma banda 281 pares de base (pb) e o alelo de inserção pela presença de dois fragmentos, com 240 pb e 45 pb, respectivamente.

3.4 Análises estatísticas

Os dados dos indivíduos foram tabulados no software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 21.0 e analisados no mesmo programa com auxílio de mais dois softwares, Plink (*Whole genome data analysis toolset*) e MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*). O nível de significância adotado para as análises estatísticas foi de $p < 0,05$. As frequências alélicas foram estimadas por contagem direta e o equilíbrio de Hardy-Weinberg, para as frequências genotípicas, foi testado pelo teste do qui-quadrado de Pearson. Os testes estatísticos realizados foram ANOVA ou Kruskal-Wallis e qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, dependendo do tipo (qualitativo ou quantitativo) e distribuição (normal ou não normal) dos desfechos investigados (software SPSS).

A associação dos polimorfismos investigados com a DAC foi avaliada pelo teste de regressão logística e a associação da DAC com as variáveis bioquímicas foi testada por regressão linear, ambas associações avaliadas para modelo aditivo, dominante e recessivo, com p ajustado para gênero e p ajustado para gênero, idade, consumo de tabaco (ex e atuais fumantes), uso de álcool e uso de medicação, as quais eram possíveis variáveis confundidoras (software Plink). As interações gene-gene foram exploradas com auxílio do programa MDR para avaliar epistasia potencial.

3.5 Aspectos éticos

Este estudo está inserido no projeto de pesquisa institucional “Aspectos moleculares, ambientais e biomarcadores proteicos nas doenças multifatoriais”,

coordenado pela professora Dra. Verônica Contini, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Univates (COEP/UNIVATES), de acordo com a Resolução 196/96, que atualmente foi substituída pela nova Resolução 466 de 2012, e pela Direção Científica do Hospital Bruno Born, em maio de 2012. O sigilo à identidade dos sujeitos é garantido através da utilização de códigos.

3.6 Financiamento

O projeto “Aspectos moleculares, ambientais e biomarcadores proteicos nas doenças multifatoriais” foi contemplado com edital de financiamento interno do Centro Universitário UNIVATES, através da Fundação Vale do Taquari de Educação e Desenvolvimento Social (FUVATES).

4 RESULTADOS

A amostra total foi constituída por 707 indivíduos (408 homens e 299 mulheres), com idade média de 62 anos. Foram incluídos, de acordo com os critérios estabelecidos, 340 (48,1%) casos de DAC e 367 (51,9%) indivíduos controles. As características clínicas gerais dos participantes do estudo, categorizados de acordo com o gênero, estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Características clínicas dos participantes de acordo com o gênero.

	Todos n = 707	Mulheres n = 299	Homens n = 408	P
Idade (anos)	62,9 (11,0)	64,0 (11,4)	62,1 (10,6)	0,025
Atual fumante (sim)	95 (13,4)	31 (10,4)	64 (15,7)	0,044
Ex-fumante (sim)	279 (39,5)	66 (22,1)	213 (52,2)	<0,0001
Uso de álcool (sim)	217 (30,7)	53 (17,7)	164 (40,2)	<0,0001
Atividade física (sim)	272 (38,5)	112 (37,5)	160 (39,2)	0,639
Uso de medicação (sim)				
Dislipidemias (sim)	304 (43,0)	128 (42,8)	176 (43,1)	0,938
Hipertensão (sim)	514 (72,7)	226 (75,6)	288 (70,6)	0,147
Diabetes (sim)	102 (14,4)	41 (13,7)	61 (15,0)	0,666
DAC (sim)	83 (11,7)	38 (12,7)	45 (11,0)	0,554
Variáveis bioquímicas				
Glicose (mg/dL)	107,9 (36,1)	108,2 (40,7)	107,8 (32,3)	0,885
Colesterol total (mg/dL)	162,8 (48,9)	168,0 (50,1)	159,1 (47,7)	0,017
HDL (mg/dL)	42,2 (12,7)	45,5 (12,5)	39,9 (12,4)	<0,0001
LDL (mg/dL)	97,8 (41,3)	100,3 (43,7)	95,9 (39,3)	0,169
Triglicerídeos (mg/dL)	114,1 (60,5)	111,3 (52,5)	116,2 (65,8)	0,275

Todos dados estão expressos em n e (%) ou em média e (desvio padrão). Abreviações: DAC, doença arterial coronariana; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade.

Fonte: Da autora (2016).

A caracterização clínica dos indivíduos conforme a classificação caso e controle para a DAC está descrita na tabela 6. Foram encontradas diferenças significativas

para as variáveis gênero, idade, tabagismo (ex-fumante), uso de medicação para dislipidemias, HDL-colesterol e LDL-colesterol. Essas variáveis foram posteriormente consideradas possíveis co-variáveis nos testes de associações com os genótipos.

Tabela 6. Características clínicas dos participantes de acordo com o status caso-controle.

	Casos n = 340	Controles n = 367	P
Gênero (homens)	232 (31,8)	176 (52,0)	<0,0001
Idade (anos)	64,2 (10,4)	61,6 (11,3)	0,002
Atual fumante (sim)	55 (16,2)	40 (10,9)	0,052
Ex-fumante (sim)	160 (47,1)	119 (32,4)	<0,0001
Uso de álcool (sim)	98 (28,8)	119 (32,4)	0,339
Atividade física (sim)	137 (40,3)	135 (36,8)	0,378
Uso de medicação (sim)			
Dislipidemias (sim)	161 (47,4)	143 (39,0)	0,030
Hipertensão (sim)	249 (73,2)	265 (72,2)	0,824
Diabetes (sim)	55 (16,2)	47 (12,8)	0,243
DAC (sim)	38 (11,2)	45 (12,3)	0,741
Variáveis bioquímicas			
Glicose (mg/dL)	110,2 (39,1)	105,8 (32,9)	0,109
Colesterol total (mg/dL)	161,0 (39,1)	105,8 (32,9)	0,437
HDL (mg/dL)	40,0 (11,4)	44,32 (13,5)	0,024
LDL (mg/dL)	97,4 (39,7)	98,1 (42,7)	<0,0001
Triglicerídeos (mg/dL)	119,5 (64,1)	109,1 (56,7)	0,834

Todos dados estão expressos em n e (%) ou em média e (desvio padrão). Abreviações: DAC, doença arterial coronariana; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade.

Fonte: Da autora (2016).

A tabela 7 apresenta a posição cromossômica e a frequência do alelo menos comum (MAF, do inglês *minor allele frequency*) dos polimorfismos investigados. O cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a distribuição das frequências genotípicas, não evidenciou desvios significativos, em nenhum dos polimorfismos.

As análises de associações entre os polimorfismos investigados e a DAC estão descritas na tabela 8. Foram detectadas associações significativas com o alelo del do polimorfismo rs28362491 (-94 ATTG ins/del; gene *NFKB1*), no modelo dominante, e com o alelo T do polimorfismo rs2569190 (-260C/T; gene *CD14*), nos modelos aditivo e dominante. Para os demais polimorfismos, não foram detectadas associações significativas em nenhum dos modelos testados.

Tabela 7. Características dos polimorfismos.

Gene	rs	Polimorfismo	Cromossomo	Posição	A1	A2	MAF (todos)	MAF (mulheres)	MAF (homens)	HWE (todos)	HWE (mulheres)	HWE (homens)
<i>CD14</i>	rs2569190	-260C/T or -159C/T	5q31.1	140633331	T	C	0,473	0,438	0,498	0,404	1	0,234
<i>TLR4</i>	rs4986790	Arg299Gly or 896A/G	9q33.1	117713024	G	A	0,036	0,038	0,034	0,607	0,356	1
<i>TLR4</i>	rs4986791	Thr399Ile or 1196C/T	9q33.1	117713324	T	C	0,037	0,037	0,037	1	0,331	1
<i>NFKB1</i>	rs28362491	-94 ATTG ins/del	4q24	102500998	del	ins	0,431	0,410	0,445	0,335	0,383	0,530
<i>TNFA</i>	rs1800629	-308G/A	6p21.3	31575254	A	G	0,131	0,153	0,115	0,509	0,654	0,806
<i>TNFA</i>	rs361525	-238G/A	6p21.3	31575324	A	G	0,055	0,054	0,055	0,715	1	1

A1 representa o alelo menos comum. Abreviações: MAF, do inglês *Minor Allele Frequency*; HWE, P do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Fonte: Da autora (2016).

Tabela 8. Análise de regressão logística dos polimorfismos individuais sobre o status caso-controle.

Gene	Polimorfismo	Alelo	Modelo aditivo					Modelo dominante					Modelo recessivo				
			OR	STAT	P- 1	P- 2	P- 3	OR	STAT	P- 1	P- 2	P- 3	OR	STAT	P- 1	P- 2	P- 3
<i>CD14</i>	rs2569190	T	1,29	2,33	<u>0,0200</u>	0,0545	<u>0,0244</u>	1,55	2,54	<u>0,0112</u>	<u>0,0335</u>	<u>0,0206</u>	1,25	1,19	0,2329	0,3409	0,1892
<i>TLR4</i>	rs4986790	G	NC	NC	NC	NC	NC	1,09	0,28	0,7793	0,7341	0,8006	NC	NC	NC	NC	NC
<i>TLR4</i>	rs4986791	T	NC	NC	NC	NC	NC	1,13	0,42	0,6750	0,6949	0,7508	NC	NC	NC	NC	NC
<i>NFKB1</i>	rs28362491	del	1,13	1,09	0,2759	0,3914	0,3536	1,44	2,13	<u>0,0333</u>	<u>0,0470</u>	<u>0,0401</u>	0,87	-0,64	0,5216	0,3763	0,4053
<i>TNFA</i>	rs1800629	A	0,94	-0,37	0,7133	0,9542	0,8533	0,95	-0,28	0,7794	0,9016	0,8225	0,80	-0,41	0,6812	0,8560	0,9567
<i>TNFA</i>	rs361525	A	NC	NC	NC	NC	NC	1,15	0,58	0,5593	0,5493	0,6952	NC	NC	NC	NC	NC

Abreviações: OR, odds ratio; STAT, do inglês *Statistics*; NC, não calculado devido a baixas frequências de alelos menos comuns.

P- 1: não ajustado; P- 2: ajustado para gênero; P- 3: ajustado para gênero, idade, uso de tabaco (atual e anterior), uso de álcool e uso de medicações.

Fonte: Da autora (2016).

As análises dos efeitos dos polimorfismos nas variáveis clínicas dos indivíduos incluídos no estudo estão descritas nas tabelas 9 (glicemia) e 10 (perfil lipídico). Nas análises da glicemia, os resultados indicaram um efeito dos polimorfismos investigados nos genes *TLR4* e *TNF α* . Portadores dos alelos G e T dos polimorfismos rs4986790 e rs4986791, respectivamente, ambos localizados no gene *TLR4*, apresentam um aumento significativo nos níveis séricos de glicose, no modelo dominante. Para o polimorfismo rs1800629, localizado no gene *TNF α* , observou-se um aumento significativo nos níveis séricos de glicose, tanto no modelo aditivo quanto no modelo recessivo, em portadores do alelo A.

As análises do perfil lipídico demonstraram efeitos significativos dos polimorfismos investigados nos níveis de colesterol (total, LDL e HDL) (Tabela 10). Os resultados indicaram uma associação entre os alelos del e A, dos polimorfismos rs28362491 (*NFKB1*) e rs1800629 (*TNF α*), respectivamente, com uma diminuição dos níveis séricos de colesterol total, nos modelos aditivo (rs28362491 e rs1800629) e recessivo (rs28362491). Ainda, estes mesmo indivíduos, portadores dos alelos del e A, apresentaram uma diminuição significativa nos níveis séricos de LDL-colesterol, nos modelos aditivo e dominante para o polimorfismo rs28362491, e nos modelos aditivo e recessivo para o polimorfismo rs1800629. Para o HDL-colesterol, detectou-se um efeito dos alelos G e T dos polimorfismos rs4986790 e rs4986791, respectivamente, ambos localizados no gene *TLR4*, na diminuição dos níveis séricos, no modelo dominante.

Para as interações gene-gene realizou-se uma análise exploratória no programa MDR. Porém, não foram evidenciadas interações significativas (dados não apresentados).

Tabela 9. Análise de regressão linear dos polimorfismos individuais sobre a glicose.

Gene	Polimorfismo	Alelo	Modelo aditivo					Modelo dominante					Modelo recessivo				
			b	STAT	P- 1	P- 2	P- 3	B	STAT	P- 1	P- 2	P- 3	b	STAT	P- 1	P- 2	P- 3
<i>CD14</i>	rs2569190	T	-0,55	-0,28	0,7805	0,7824	0,9401	-1,74	-0,56	0,5767	0,5778	0,9094	0,44	0,13	0,8953	0,8937	0,9953
<i>TLR4</i>	rs4986790	G	NC	NC	NC	NC	NC	15,80	2,97	0,0031	0,0031	0,0024	NC	NC	NC	NC	NC
<i>TLR4</i>	rs4986791	T	NC	NC	NC	NC	NC	14,10	2,67	0,0078	0,0078	0,0067	NC	NC	NC	NC	NC
<i>NFKB1</i>	rs28362491	del	-0,24	-0,11	0,9112	0,9123	0,7392	-0,73	-0,23	0,8177	0,8185	0,9018	0,31	0,08	0,9363	0,9352	0,6526
<i>TNFα</i>	rs1800629	A	5,56	1,98	<u>0,0481</u>	<u>0,0493</u>	0,2274	3,74	1,18	0,2395	0,2445	0,5897	31,38	3,24	0,0012	0,0013	<u>0,0120</u>
<i>TNFα</i>	rs361525	A	NC	NC	NC	NC	NC	1,25	0,28	0,7767	0,7770	0,9714	NC	NC	NC	NC	NC

Abreviações: STAT, do inglês *Statistics*; NC, não calculado devido a baixas frequências de alelos menos comuns.

P- 1: não ajustado; P- 2: ajustado para gênero; P- 3: ajustado para gênero, idade, uso de tabaco (atual e anterior), uso de álcool e uso de medicações.

Fonte: Da autora (2016).

Tabela 10. Análise de regressão linear dos polimorfismos individuais sobre o perfil lipídico.

Gene	Polimorfismo	Alelo	Modelo aditivo					Modelo dominante					Modelo recessivo				
			b	STAT	P- 1	P- 2	P- 3	b	STAT	P- 1	P- 2	P- 3	b	STAT	P- 1	P- 2	P- 3
Colesterol																	
CD14	rs2569190	T	-0,5	-0,2	0,8492	0,9809	0,8058	1,95	0,46	0,6443	0,4951	0,5228	-3,72	-0,82	0,4128	0,4879	0,2569
TLR4	rs4986790	G	NC	NC	NC	NC	NC	-0,77	-0,11	0,9157	0,8872	0,9676	NC	NC	NC	NC	NC
TLR4	rs4986791	T	NC	NC	NC	NC	NC	-2,45	-0,34	0,7334	0,7352	0,8860	NC	NC	NC	NC	NC
NFKB1	rs28362491	del	-7,5	-2,8	0,0057	0,0082	0,0049	-7,20	-1,80	0,0729	0,0878	0,0778	-13,61	-2,80	0,0053	0,0074	0,0028
TNFA	rs1800629	A	-6,6	-1,7	0,0860	0,0541	<u>0,0488</u>	-7,20	-1,68	0,0943	0,0613	0,0522	-10,61	-0,80	0,4223	0,3604	0,4885
TNFA	rs361525	A	NC	NC	NC	NC	NC	-3,18	-0,53	0,5940	0,5914	0,7050	NC	NC	NC	NC	NC
HDL																	
CD14	rs2569190	T	-0,53	-0,76	0,4457	0,7829	0,4246	-0,40	-0,36	0,7174	0,8890	0,6999	-1,06	-0,90	0,3698	0,5391	0,3285
TLR4	rs4986790	G	NC	NC	NC	NC	NC	-4,49	-2,40	<u>0,0169</u>	<u>0,0113</u>	<u>0,0436</u>	NC	NC	NC	NC	NC
TLR4	rs4986791	T	NC	NC	NC	NC	NC	-4,88	-2,62	<u>0,0090</u>	0,0076	<u>0,0255</u>	NC	NC	NC	NC	NC
NFKB1	rs28362491	del	-0,62	-0,84	0,4008	0,5653	0,5908	-1,07	-0,98	0,3274	0,4211	0,4646	-0,43	-0,32	0,7486	0,9560	0,7934
TNFA	rs1800629	A	1,44	1,45	0,1463	0,3066	0,2671	1,79	1,60	0,1096	0,2311	0,1886	0,40	0,12	0,9079	0,8891	0,8930
TNFA	rs361525	A	NC	NC	NC	NC	NC	1,16	0,75	0,4517	0,4450	0,3917	NC	NC	NC	NC	NC
LDL																	
CD14	rs2569190	T	0,3	0,1	0,8878	0,7879	0,9453	3,05	0,86	0,3906	0,3217	0,2979	-2,64	-0,69	0,4917	0,5401	0,3039
TLR4	rs4986790	G	NC	NC	NC	NC	NC	1,20	0,20	0,8440	0,8598	0,7702	NC	NC	NC	NC	NC
TLR4	rs4986791	T	NC	NC	NC	NC	NC	0,30	0,05	0,9605	0,9589	0,8402	NC	NC	NC	NC	NC
NFKB1	rs28362491	del	-6,3	-2,8	0,0060	0,0076	0,0034	-5,69	-1,67	0,0950	0,1072	0,0792	-12,06	-2,93	0,0036	0,0045	0,0015
TNFA	rs1800629	A	-7,1	-2,2	<u>0,0281</u>	<u>0,0204</u>	<u>0,0200</u>	-8,07	-2,23	<u>0,0262</u>	<u>0,0193</u>	<u>0,0163</u>	-8,59	-0,77	0,4413	0,4043	0,5698
TNFA	rs361525	A	NC	NC	NC	NC	NC	-5,08	-1,01	0,3120	0,3111	0,3988	NC	NC	NC	NC	NC
Triglicerídeos																	
CD14	rs2569190	T	-1,52	-0,46	0,6486	0,5840	0,6817	-3,58	-0,69	0,4920	0,4350	0,5757	-0,16	-0,03	0,9775	0,9344	0,9388
TLR4	rs4986790	G	NC	NC	NC	NC	NC	13,04	1,46	0,1462	0,1418	0,2053	NC	NC	NC	NC	NC
TLR4	rs4986791	T	NC	NC	NC	NC	NC	10,97	1,23	0,2178	0,2183	0,2952	NC	NC	NC	NC	NC
NFKB1	rs28362491	del	-2,62	-0,73	0,4632	0,4322	0,5040	-2,11	-0,40	0,6903	0,6640	0,7795	-5,38	-0,84	0,4034	0,3762	0,4106
TNFA	rs1800629	A	-4,69	-0,99	0,3222	0,3612	0,2432	-4,68	-0,88	0,3809	0,4220	0,3118	-12,02	-0,73	0,4630	0,4898	0,3220
TNFA	rs361525	A	NC	NC	NC	NC	NC	3,76	0,51	0,6104	0,6099	0,6480	NC	NC	NC	NC	NC

Abreviações: STAT, do inglês *Statistics*; NC, não calculado devido a baixas frequências de alelos menos comuns.

P- 1: não ajustado; P- 2: ajustado para gênero; P- 3: ajustado para gênero, idade, uso de tabaco (atual e anterior), uso de álcool e uso de medicações.

Fonte: Da autora (2016).

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo avaliou o efeito de seis polimorfismos, localizados em quatro genes envolvidos com o processo inflamatório, na DAC. Nossos achados demonstraram uma associação dos polimorfismos rs2569190, localizado no gene *CD14*, e rs28362491, localizado no gene *NFKB1*, com a DAC. Além disso, também evidenciaram efeitos significativos dos polimorfismos investigados em variáveis clínicas relacionadas com o desenvolvimento da doença. Foram detectados efeitos dos polimorfismos nos genes *TLR4* e *TNF α* nos níveis glicêmicos e dos polimorfismos nos genes *TLR4*, *NFKB1* e *TNF α* no perfil lipídico, mais especificamente nos níveis de colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol. Em conjunto, esses achados corroboram a importância de variantes genéticas do processo inflamatório na DAC.

A literatura que aborda as variantes genéticas relacionadas ao processo inflamatório na DAC é excedente, porém ainda apresenta achados inconsistentes. A associação dos polimorfismos rs2569190 (alelo T) do gene *CD14* e rs28362491 (alelo del) do gene *NFKB1* com a DAC, verificada no nosso estudo, já foi evidenciada por uma série de estudos (KONDO et al., 2003; LAI et al., 2015; LIMA-NETO et al., 2013; YANG et al., 2014). Bernardo e colaboradores (2006) encontraram associação significativa do polimorfismo do gene *CD14* com níveis séricos aumentados de proteína C reativa, consequentemente, com maior risco isquêmico. Já uma meta-análise recente relatou a associação do polimorfismo rs28362491 do gene *NFKB1*, com risco aumentado para DAC de 21% em caucasoides e de 47% em asiáticos (CHEN et al., 2016).

É bem estabelecido que o processo inflamatório tem papel chave no desenvolvimento e progressão da DAC, no qual o NFκB é o mediador principal desse processo. Entretanto, o receptor de membrana de monócitos/macrófagos CD14 tem um papel importante na inflamação também, uma vez que esse receptor de membrana reconhece microrganismos e outros fatores de estresse exógeno e endógenos, como por exemplo a LDL-ox acumulada na parede das artérias. O reconhecimento do agente agressor pelo CD14 aciona a via de sinalização que conduz a ativação do fator de transcrição NFκB, que por sua vez promove o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNFα (HOAREAU et al., 2010; DE LOERA-RODRIGUEZ et al., 2014; YONG et al., 2016).

O polimorfismo rs2569190 no gene *CD14* pode levar a uma resposta diferencial do receptor de monócitos/macrófagos, onde estudos tem demonstrado que esse polimorfismo pode aumentar a atividade promotora do gene, alterando a expressão de CD14 de membrana e CD14 solúvel (LEVAN et al., 2001; ENG et al., 2004; CANTONE et al., 2016). Porém, outras análises relatam que o polimorfismo rs2569190, no gene *CD14*, situa-se próximo ao domínio de ligação do fator de transcrição Sp1. Dessa forma, o polimorfismo pode levar a redução da ligação de Sp1 ao seu domínio no DNA, e aumentar a expressão de *CD14*. Esse efeito aumenta os níveis de CD14 solúvel e aumenta a densidade de CD14 ligado à membrana. Portanto, o aumento de CD14 faz com que ocorra uma maior ativação da via de sinalização NFκB e, conseqüentemente, aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando o risco de desenvolvimento de DAC (LEVAN et al., 2001; MERTENS et al., 2009; CANTONE et al., 2016; YONG et al., 2016).

A partir do reconhecimento da LDL-ox acumulada na parede das artérias, na aterosclerose, pelo CD14, a via de sinalização NFκB é ativada, sendo este fator de transcrição responsável pela regulação da transcrição de aproximadamente 200 genes alvos, podendo esses serem pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios. O papel do NFκB como pró ou anti-inflamatório é determinado pelas suas subunidades, onde o gene *NFKB1*, cuja expressão é influenciada pelo polimorfismo rs28362491, codifica a subunidade p50. O homodímero de p50/p50 tem propriedades anti-inflamatórias por inibição da transcrição de citocinas pró-inflamatórias como a TNFα e a IL-12, e ativação da transcrição de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (KARBAN et al.,

2004; PEREIRA; OAKLEY, 2008). Enquanto o heterodímero p65/p50, mais abundante no processo inflamatório, apresenta propriedades pró-inflamatórias, ao estimular a transcrição das citocinas pró-inflamatórias, tais como $TNF\alpha$, IL-1 β e IL-6 (LAI et al., 2015; PERKINS, 2007; YOSHINO et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

A associação do polimorfismo rs28362491 do gene *NFKB1* com a DAC pode estar relacionada com o fato de o genótipo deleção/deleção ser responsável pela *down-regulation* da subunidade p50, através da redução ou destruição dos sítios de ligação do fator de transcrição (CAO et al., 2006; PEREIRA; OAKLEY, 2008). Uma vez que os níveis baixos da subunidade p50 afetam principalmente a concentração do homodímero p50/p50, mais do que a concentração do heterodímero p50/p65, mostra que o genótipo del/del para o polimorfismo rs28362491 do gene *NFKB1* pode contribuir para a patogênese da DAC, associado com uma resposta pró-inflamatória maior (CHEN et al., 2016a; LAI et al., 2015; STEGGER et al., 2013; YOSHINO et al., 2016).

Com relação aos genes *TLR4* e *TNF α* outros estudos também não encontraram associação dos polimorfismos rs4986790, rs4986791, rs1800629 e rs361525 com a DAC (KOCH et al., 2006; SUKHININA et al., 2012; HEIDARI et al., 2015; CHEN et al., 2016). Ainda, cabe ressaltar que mesmo não tendo sido detectadas associações desses polimorfismos com a DAC, no nosso estudo, não se descarta a importância desses genes na patologia.

Ainda, ao avaliarmos as variáveis bioquímicas dos indivíduos participantes do estudo, detectamos associação dos polimorfismos rs4986790 (alelo G) e rs4986791 (alelo T) do gene *TLR4* e rs1800629 (alelo A) do gene *TNF α* com os níveis séricos de glicose aumentados, em comparação aos portadores dos alelos ancestrais. É de comum acordo na literatura que os níveis séricos elevados de glicose e, consequentemente, a diabetes mellitus, são fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular (MEIGS, 2003; D'AGOSTINO et al., 2008; LERARIO et al., 2008). Resultados de estudos do grupo DECODE (*Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe*), que avaliaram o risco de morte para doenças cardiovasculares em indivíduos com e sem DM, indicaram um aumento de 50% de risco de morte para DCV quando os indivíduos apresentavam níveis séricos de glicose aumentados, o que corrobora a relação dos níveis elevados de glicose com as

doenças cardiovasculares (DECODE STUDY GROUP, THE EUROPEAN DIABETES EPIDEMIOLOGY GROUP., 2001; COLEMAN et al., 2007).

Estudos em modelos animais, cultura de células e de associação mostram que a diabetes, ou aumento dos níveis séricos de glicose, podem estar associados com a resposta imune (UYSAL et al., 1997; FERNÁNDEZ-REAL et al., 2000; KOLB; MANDRUP-POULSEN, 2005), uma vez que a dieta dos indivíduos, como por exemplo, o alto consumo de ácidos graxos saturados, está interligado com os altos níveis de glicose e de perfil lipídico na corrente sanguínea, que levam à altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (BAER et al., 2004; BASU, 2006). Além disso, as altas taxas de ácidos graxos saturados levam ao acúmulo do mesmo nos adipócitos e em macrófagos, que podem induzir à obesidade e, posteriormente, ao desenvolvimento de resistência à insulina, principalmente se houver acúmulo de adipócitos no fígado (SEPPÄLÄ-LINDROOS et al., 2002; BASTARD et al., 2006; THAMER et al., 2007; WEYRICH et al., 2010).

Ainda, a ligação entre o sistema imune inato e a obesidade ocorre devido as características comuns dos macrófagos e adipócitos, os quais secretam vários quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Com isso, ambos os adipócitos e macrófagos expressam o receptor de membrana TLR4. Dessa forma, as variantes genéticas rs4986790 e rs4986791 do gene *TLR4* podem agir em células diferentes além dos macrófagos, principalmente em adipócitos armazenados no fígado, onde os polimorfismos do gene *TLR4* vão fazer com que a expressão do gene aumente e mais citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α sejam ativadas no fígado, o que leva a resistência à insulina, ou seja, aumento dos níveis de glicose na corrente sanguínea. Contudo, com a ativação da transcrição do gene *TNF α* , a variante genética nesse gene também pode aumentar a expressão do mesmo e contribuir para o aumento dos níveis séricos de glicose.

Além disso, ocorre também a diminuição de níveis séricos de HDL-colesterol e aumentos dos demais componentes do perfil lipídico, resultado esse que vai de acordo com nossos achados, uma vez que encontramos associação significativa com o alelo de risco para os polimorfismos rs4986790 e rs4986791 e níveis diminuídos de HDL-colesterol (BASTARD et al., 2006; WONG et al., 2009; WEYRICH et al., 2010). Em resumo, estes polimorfismos estão relacionados principalmente com o aumento do

consumo de ácidos graxos saturados, oriundos da dieta e da baixa prática de exercício físico, que levam ao desenvolvimento de obesidade (KUBASZEK et al., 2003; FERWERDA et al., 2008; KOLZ et al., 2008; STEINHARDT et al., 2010; CUDA et al., 2011).

Para as variantes bioquímicas colesterol total e LDL-colesterol encontramos associação dos portadores do alelo del e do alelo A, para os polimorfismos rs28362491 no gene *NFKB1* e rs1800629 no gene *TNF α* , respectivamente, com a diminuição nos níveis de ambos os colesteróis. Esses resultados vão em confronto com a maioria dos estudos de associação, onde os autores relatam associação dos alelos de risco del e A, para os polimorfismos rs28362491 e rs1800629, com o aumento do colesterol total e do LDL-colesterol (MALLIK; MAJUMDER, 2011; AZADBAKHT et al., 2016; BALÖTŠEV et al., 2016; DOMINGUES et al., 2016; LIANG et al., 2016).

Entretanto, estudos com modelos animais vem levantando hipóteses que podem explicar nossos achados. Sabe-se que o fator de transcrição *PPAR* (*peroxisome proliferator-activated receptors*) está envolvido na regulação de vários genes que controlam o metabolismo de ácidos graxos. Porém, a atividade deste fator é reprimida pelo gene *NF κ B* quando o mesmo está ativado. Ou seja, o alto consumo de ácidos graxos necessita da regulação do seu metabolismo pela ativação de diversos genes através do fator de transcrição *PPAR*, mas esse, por sua vez, está bloqueado, já que os níveis aumentados de gordura na corrente sanguínea ativam a via de sinalização *NF κ B* para a produção de citocinas pró-inflamatórias (HUNTER; KANDARIAN, 2004; RAZEGHI et al., 2007). Porém, achados sugerem que a variante genética rs28362491, no gene *NFKB1*, na qual portadores do alelo del apresentam diminuição da expressão da subunidade p50, apresentam níveis de colesterol total e LDL-colesterol diminuídos, devido a ativação do fator de transcrição *PPAR*, uma vez que com a diminuição da subunidade p50 o *NF κ B* não consegue bloquear a ação do *PPAR* normalmente (MINEGISHI et al., 2015).

Já para o gene *TNF α* alguns estudos vem sugerindo que o aumento desta citocina pró-inflamatória está relacionada com a diminuição dos níveis séricos de perfil lipídico, assim como os nossos resultados, no qual portadores do alelo menos comum para o polimorfismo rs1800629 apresentaram níveis séricos de colesterol total e LDL-

colesterol diminuídos (LEBOEUF, 1998; DAIËN et al., 2012; SCHREYER; CHUA; YE; MCGUINNESS, 2013; LIN et al., 2015; CHEN et al., 2016; HASSAN et al., 2016). Acredita-se que esses resultados são provenientes do aumento da expressão do gene *TNF α* em portadores do alelo A para o polimorfismo rs1800629, que está localizado na região promotora do gene. Esse aumento por sua vez, além de regular positivamente os níveis da citocina pró-inflamatória *TNF α* , aumenta a atividade do receptor LDL, que captura maior número de moléculas de colesterol da corrente sanguínea, fazendo a síntese do mesmo no fígado, diminuindo, então, os níveis séricos de colesterol total e LDL-colesterol (GOUNI et al., 1993; FRAUNBERGER et al., 1998; DAIËN et al., 2012).

Nossos resultados devem ser interpretados considerando algumas limitações. Em primeiro lugar, os níveis circulantes de *CD14*, *TLR4*, *NF κ B* e *TNF α* não foram medidos para validar os resultados. Em segundo lugar, o tamanho da amostra é relativamente pequeno. Entretanto, nos permitiu alcançar poder estatístico suficiente para realizar nossas análises. Além disso, esses dados podem ser incorporados em meta-análises futuras. Ainda, trata-se de resultados exploratórios para os quais não foram feitas correções para múltiplos testes. Dessa forma, mais estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para confirmar nossos resultados.

Os números elevados de morbimortalidade para DAC e a previsão de aumento dessas taxas para os próximos anos, e, conseqüentemente, de suas complicações, salienta a importância de estudos que colaborem para os processos patogênicos da DAC. Os estudos de associação de variantes genéticas são um destes caminhos para desvendar os processos biológicos da DAC, permitindo que populações com maior susceptibilidade recebam maior atenção e não sejam prejudicados pela doença.

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos resultados sugerem um papel dos polimorfismos rs2569190 (gene *CD14*) e rs28362491 (gene *NFKB1*) na DAC, além da influência de polimorfismos rs4986790, rs4986791 (gene *TLR4*) e rs1800629 (gene *TNF α*) nos níveis séricos de glicose e HDL-colesterol e dos polimorfismos rs28362491 (gene *NFKB1*) e rs1800629 (gene *TNF α*) nos níveis séricos de colesterol total e LDL-colesterol, nos indivíduos da nossa amostra. Esses achados estão de acordo com outros estudos que associam consistentemente o processo inflamatório com o perfil lipídico e com a fisiopatologia da DAC.

REFERÊNCIAS

AKIRA, A. TLR signaling. **Curr Top Microbiol immunol**, v. 311, p. 1-16, 2006.

AL SHAHI, H.; SHIMADA, K.; MIYAUCHI, K.; YOSHIHARA, T.; SAI, E.; SHIOZAWA, T.; NAITO, R.; AIKAWA, T.; OUCHI, S.; KADOGUCHI, T.; MIYAZAKI, T.; DAIDA, H. Elevated Circulating Levels of Inflammatory Markers in Patients with Acute Coronary Syndrome. **Int J Vasc Med**, 2015.

ALLEN, R. A.; LEE, E. M.; ROBERTS, D. H.; PARK, B. K.; PIRMOHAMED, M. Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. **Eur J Clin Invest**, v. 31, n. 10, p. 843-51, 2001.

AMEZIANE, N.; BEILLAT, T.; VERPILLAT, P.; CHOLLET-MARTIN, S.; AUMONT, M-C.; SEKNADJI, P.; LAMOTTE, M.; LEBRET, D.; OLLIVIER, V.; DE PROST, D. Association of the Toll-Like Receptor 4 Gene Asp299Gly Polymorphism With Acute Coronary Events. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 61-64, 2003.

ANUJUO, K.; STRONKS, K.; SNIJDER, M. B.; JEAN-LOUIS, G.; RUTTERS, F.; VAN DEN BORN, B. J.; PETERS, R. J.; AGYEMANG, C. Relationship between short sleep duration and cardiovascular risk factors in a multi-ethnic cohort - the helius study. **Sleep Med**, v. 16, n. 12, p. 1482-8, 2015.

AO, R.; WANG, Y.; ZHNAG, D. R.; DU, Y. Q. Role of TLR4 rs4986790A>G and rs4986791C>T Polymorphisms in the Risk of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterol Res Pract**, 2015.

ARBOUR, N. C. et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nature genetics**, v. 25, n. 2, p. 187-91, 2000.

ARROYO-ESPLIGUERO, R.; EL-SHARNOUBY, K.; VÁZQUEZ-REY, E.; KALIDAS, K.; JEFFERY, S.; KASKI, J. C. CD14 C(-260)T promoter polymorphism and prevalence of acute coronary syndromes. **Int J Cardiol**, v. 98, n. 2, p. 307-12, 2005.

ATANASOVSKA, B.; KUMAR, V.; FU, J.; WIJMENGA, C.; HOFKER, M. H. GWAS as a Driver of Gene Discovery in Cardiometabolic Diseases. **Trends Endocrinol Metab**, 2015.

AZADBAKHT, L. et al. Consumption of energy-dense diets in relation to metabolic syndrome and inflammatory markers in Iranian female nurses. **Public Health Nutrition**, p. 1–9, 2016.

BAER, D. J. et al. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 6, p. 969–73, 2004.

BALŮTŠEV, R. et al. Inflammatory, cardio-metabolic and diabetic profiling of chronic schizophrenia. **European Psychiatry**, v. 39, p. 1–10, 2016.

BANK, S.; SKYTT, A. P.; BURISCH, J.; PEDERSEN, N.; ROUG, S.; GALSGAARD, J.; YDEGAARD, T. S.; BRODER B. J.; RASHID, S.; KAISER, R. B.; AVLUND, S.; BASTHOLM, O. T.; JÜRGEN, H. H.; KRAGH, T. M.; OSTERGAARD, T. V.; FRYDENBERG, M.; ANDERSEN, N. B.; SODE, J.; VOGEL, U.; ANDERSEN, V. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

BARBER, R. C.; ARAGAKI, C. C.; RIVERA-CHAVES, F. A.; PURDUE, G. F.; HUNT, J. L.; HORTON, J. W. TLR4 and TNF- α polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following Burn injury. **J Med Gen**, v. 48, p. 808-813, 2004.

BATISTA, F. D.; HARWOOD, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 15-27, 2009.

BASTARD, J.-P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European cytokine network**, v. 17, n. 1, p. 4–12, mar. 2006.

BASU, A. Dietary Factors That Promote or Retard Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 5, p. 995–1001, 2006.

BEIJK, M. A.; BOEKHOLDT, S. M.; RITTERSMA, S. Z.; PONS, D.; ZWINDERMAN, A. H.; DOEVENDANS, P. A.; TIO, R. A.; TIJSSEN, J. G.; JUKEMA, J. W.; DE WINTER, R. J. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms show no association with the risk of clinical or angiographic restenosis after percutaneous coronary intervention. **Pharmacogenet Genomics**, v. 20, n. 9, p. 544-52, 2010.

BERNARDO, E.; ANGIOLILLO, D. J.; RAMÍREZ, C.; CAVALLARI, U.; TRABETTI, E.; SABATÉ, M.; HERNÁNDEZ, R.; MORENO, R.; ESCANED, J.; ALFONSO, F.; BAÑUELOS, C.; COSTA, M. A.; BASS, T. A.; PIGNATTI, P. F.; MACAYA, C.; FERNANDEZ-ORTIZ, A. Influence of the CD14 C260T promoter polymorphism

on C-reactive protein levels in patients with coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 98, n. 9, p. 1182-4, 2006.

BERRY, J. D.; DYER, A.; CAI, X.; GARSIDE, D. B.; NING, H.; THOMAS, A.; GREENLAND, P.; VAN HORN, L.; TRACY, R. P.; LLOYD-JONES, D. M. Lifetime risks of cardiovascular disease. **N Engl J Med**, v. 366, n. 4, p. 321-9, 2012.

BJÖRKBACKA, H.; KUNJATHOOR, V. V.; MOORE, K. J.; KOEHN, S.; ORDIJA, C. M.; LEE, M. A.; MEANS, T.; HALMEN, K.; LUSTER, A. D.; GOLENBOCK, D. T.; FREEMAN, M. W. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. **Nat Med**, v.10, n. 4, p. 416-21, 2004.

BOCCARDI, V.; RIZZO, M.R.; MARFELLA, R.; PAPA, M.; ESPOSITO, A.; PORTOGHESE, M.; PAOLISSO, G.; BARBIERI, M. -94 ins/del ATTG NFKB1 gene variant is associated with lower susceptibility to myocardial infarction. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 21, n. 9, p. 679-84, 2011.

BOEKHOLDT, S. M.; AGEMA, W. R.; PETERS, R. J.; ZWINDERMAN, A. H.; VAN DER WALL, E. E.; REITSMA, P. H. KASTELEIN, J. J.; JUKEMA, J. W.; REGRESSION GROWTH EVALUATION STATIN STUDY. Variants of toll like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. **Circulation**, v. 107, n. 19, p. 2416-21, 2003.

BORGES, A. S. **Fas Ligando como indicador de apoptose na doença coronária**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Universidade de Lisboa, 2009.

BORGES, C. F.; BUSNELLO, F. M.; PELLANDA, L. C. Identificação de fatores de risco cardiovascular em pais: cuidadores de crianças cardiopatas. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, 2012.

BORISSOFF, J. I.; SPRONK, H.; TEN CATE, H. The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis. **N Engl J Med**, v. 364, n. 18, 2011.

BOVIJN, C.; DESMET, A-S.; UYTENDAELE, I.; ACKER, T. V.; TAVERNIER, J.; PEELMAN, F. Identification of Binding Sites for Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 (MyD88) and Toll-like Receptor 4 in MyD88 Adapter-like (Mal). **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 288, n. 17, p. 12054–12066, 2013.

BRAND, K.; PAGE, S.; WALLI, A. K.; NEUMEIER, D.; BAEUERLE, P. A. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. **Exp Physiol**, v. 82, p. 297-304, 1997.

BRASIL. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo brasileiro de cardiologia**. São Paulo, 2001.

BRASIL. V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo brasileiro de cardiologia**. São Paulo, 2013.

BRASIL. V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Rev Bras Hipertens**, v. 13, n. 4, p. 256-312, 2006.

BRAUTBAR, A.; BALLANTYNE, C. M.; LAWSON, K.; NAMBI, V.; CHAMBLESS, L.; FOLSOM, A. R.; WILLERSON, J. T.; BOERWINKLE, E. Impact of adding a single allele in the 9p21 locus to traditional risk factors on reclassification of coronary heart disease risk and implications for lipid-modifying therapy in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 2, n. 3, p. 279–285, 2009.

BRAUTBAR, A.; POMPEII, L. A. A genetic risk score based on direct associations with coronary heart disease improves coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), but not in the Rotterdam and Framingham Offspring, Studies. **Artherosclerosis**, p. 421-426, 2012.

BUYSSCHAERT, I.; CARRUTHERS, K. F.; DUNBAR, D. R.; PEUTEMAN, G.; RIETZSCHEL, E.; BELMANS, A.; HEDLEY, A.; DE MEYER, T.; BUDAJ, A.; VAN DE WERF, F.; LAMBRECHTS, D.; FOX, K. A. A variant at chromosome 9p21 is associated with recurrent myocardial infarction and cardiac death after acute coronary syndrome: The GRACE Genetics Study. **European Heart Journal**, v. 31, p. 1132–1141, 2010.

CALICH, V. L. G.; PINA, A.; FELONATO, M.; BERNARDINHO, S.; COSTA, T. A.; LOURES, F. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and Myd88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, p. 1-7, 2008.

CANTONE, L. et al. Particulate matter exposure is associated with inflammatory gene methylation in obese subjects. **Environmental Research**, 2016.

CANUEL, M.; SUN, X.; ASSELIN, M-C; PARAMITHIOTIS, E.; PRAT, A.; SEIDAH, N. G. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Can Mediate Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP-1). **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

CAO, S. et al. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26041–50, 8 set. 2006.

CARDIOGRAMPLUSC4D CONSORTIUM et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. **Nat Genet**, v. 45, n. 1, p. 25-33, 2013.

CECON, E. **Fator de transcrição NFkB em glândulas pineais de ratos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência- Fisiologia geral) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CHEN, Q.-J. et al. Association Between the NFkB1-94ins/del ATTG Polymorphism (rs28362491) and Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-

Analysis. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 20, n. 3, p. 105–11, 2016.

CHEN, X. et al. High-Fat Diet Induces Distinct Metabolic Response in Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Knockout Mice. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 36, n. 10, p. 580–588, 2016.

CHENG, Z.; TAYLOR, B.; OURTHIAGUE, D.R.; HOFFMANN, A. Distinct single cell signaling characteristics are conferred by the MyD88 and TRIF pathways during TLR4 activation. **Sci Signal**, v. 8, n. 385, 2015.

CHO, H. C.; YU, G.; LEE, M.Y.; KIM, H.S.; SHIN, D.H.; KIM, Y.N. TNF- α polymorphisms and coronary artery disease: association study in the Korean population. **Cytokine**, v. 62, p. 104–9, 2013.

COLEMAN, R. L. et al. Framingham, SCORE, and DECODE Risk Equations Do Not Provide Reliable Cardiovascular Risk Estimates in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 5, 2007.

COMPTON, T.; KURT-JONES, E. A.; BOEHME, K. W.; BELKO, J.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D. T.; FINBERG R.W. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. **J Virol**, v. 77, n. 8, p. 4588-96, 2003.

CORRÊA-CAMACHO, C. R.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq Ciênc Saúde**, v. 14, n.1, p. 41 48, 2007.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, D. Jr.; ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T.; DE SOUZA, A. W. S.; DA SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

CUDA, C. et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 are associated with factors of the metabolic syndrome and modify the association between dietary saturated fat and fasting high-density lipoprotein cholesterol. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 60, n. 8, p. 1131–5, 2011.

CUI, G.; WANG, H.; LI, R.; ZHANG, L.; LI, Z.; WANG, Y.; HUI, R.; DING, H.; WANG, D. W. Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene promoter, circulating TNF- α level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 235, 2012.

CURRAN, J. E.; WEINSTEIN, S. R.; GRIFFITHS, L. R. Poly-morphic variants of NFKB1 and its inhibitory protein NFKBIA, and their involvement in sporadic breast cancer. **Cancer Lett**, v. 188, p. 103-7, 2002.

D'AGOSTINO, R. B.; VASAN, R. S.; PENCINA, M. J.; WOLF, P. A.; COBAIN, M; MASSARO, J. M, KANNEL, W. B. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. **Circulation**, v.117, n. 6, p. 743 53, 2008.

D'AGOSTINO, R. B.; KANNEL, W. B. Epidemiological background and design: The Framingham Study. **Proceedings of the American Statistical Association Sesquicentennial**, 1989.

DAHMER, M. K.; RANDOLPH, A.; VITALI, S.; QUASNEY, M. W. Genetic polymorphisms in sepsis. **Pediatr Crit Care Med**, v. 6, p. 61-73, 2005.

DAÏEN, C. I. et al. Effect of TNF inhibitors on lipid profile in rheumatoid arthritis: a systematic review with meta-analysis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, n. 6, p. 862–868, 2012.

DATASUS. Indicadores e dados básicos – Brasil – 2009. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d29.def>> Acesso em 20 de agosto de 2016.

DATASUS. Indicadores e dados básicos – Brasil – 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d29.def>>. Acesso em 20 de agosto de 2016.

DE ANDRADE, J. P.; PIVA E MATTOS, L. A.; CARVALHO, A. C.; MACHADO, C.; DE OLIVEIRA, G.M. M. Programa Nacional de Qualificação de Médicos na Prevenção e Atenção Integral às Doenças Cardiovasculares. **Arq Bras Cardiol**, v. 100, n. 3, p. 203-211, 2013.

DE CARVALHO, A.C. A.; OLIVEIRA, L. S. A. F.; DE MELO, D. P.; CRUSOÉ REBELLO, I.; CAMPOS, P. S. F. Desenvolvimento de placas de ateroma em pacientes diabéticos e hipertensos. **R. Ci. méd. biol.**, v. 9, p. 73-77, 2010.

DE LOERA-RODRIGUEZ, C. O. et al. Over-expression of TLR4-CD14, pro-inflammatory cytokines, metabolic markers and NEFAs in obese non-diabetic Mexicans. **Journal of Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 39, 29 dez. 2014.

DE OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; TSA; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, 2011.

DECODE STUDY GROUP, THE EUROPEAN DIABETES EPIDEMIOLOGY GROUP. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. **Archives of internal medicine**, v. 161, n. 3, p. 397–405, 2001.

DOMINGUES, N. et al. Cholesteryl hemiesters alter lysosome structure and function and induce proinflammatory cytokine production in macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2016.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; BENSON, I. M.; MILL, J. G.; SCHIMIDT, M. I.; LOTUFO, P. A.; VIGO, A.; BARRETO, S. M. Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Rev Saúde Pública**, v. 46, p. 126-34, 2012.

DUNSTAN, E. et al. TLR4 polymorphism is not associated with biopsy proven giant cell arteritis. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 32, n. 3, p. S26-9, 2014.

DŽUMHUR, A.; ZIBAR, L.; WAGNER, J.; SIMUNDIĆ, T.; DEMBIĆ, Z.; BARBIĆ, J. Association studies of gene polymorphisms in toll-like receptors 2 and 4 in Croatian patients with acute myocardial infarction. **Scand J Immunol**, v. 75, p. 517–523, 2012.

EDFELDT, K.; BENNET, A. M.; ERIKSSON, P.; FROSTEGÅRD, J.; WIMAN, B.; HAMSTEN, A.; HANSSON, G. K.; DE FAIRE, U.; YAN, Z. Q. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. **Eur Heart J**, v. 25, p. 1447-1453, 2004.

EDFELDT, K.; SWEDENBORG, J.; HANSSON, G. K.; YAN, Z. Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. **Circulation**, v. 105, n. 10, p. 1158-61, 2002.

ELLISON, S.; GABUNIA, K.; KELEMEN, S. E.; ENGLAND, R.N.; SCALIA, R.; RICHARDS, J.M.; ORR, A.W.; TRAYLOR, J.G. JR.; ROGERS, T.; CORNWELL, W.; BERGLUND, L. M.; GONCALVES, I.; GOMEZ, M. F.; AUTIERI, M. V. Attenuation of experimental atherosclerosis by interleukin-19. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 33, n. 10, p. 2316-24, 2013.

ELSAID, A.; ABDEL-AZIZ, A.F.; ELMOUGY, R.; ELWASEEF, A.M. Association of polymorphisms G(-174)C in IL-6 gene and G(-1082)A in IL-10 gene with traditional cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 51, p. 282-292, 2014.

ENG, H. L.; CHEN, C. H.; KUO, C. C.; WU, J. S.; WANG, C. H.; LIN, T. M. Association of CD14 promoter gene polymorphism and Chlamydia pneumoniae infection. **J infect Dis**, v. 188, p. 90-97, 2003.

ENG, H. L. et al. A CD14 promoter polymorphism is associated with CD14 expression and Chlamydia-stimulated TNF α production. **Genes and Immunity**, v. 5, n. 5, p. 426–430, 27 jul. 2004.

ERRIDGE, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? **J Leukoc Biol**, v. 87, p. 989-999, 2010.

ERTAN, P.; BERDELI, A.; YILMAZ, O.; GONULAL, D. A.; YUKSEL, H. LY96, UPKIB Mutation and TLR4, CD14, MBL Polymorphisms in Children with Urinary Tract Infection. **Indian J Pediatr**, 2011.

ESKANDARI-NASAB, E.; MOGHADAMPOUR, M.; SEPANJ-NIA, A. TNF- α 238, -308, -863 polymorphisms, and brucellosis infection. **Hum Immunol**, 2015.

EVANS, S.S.; REPASKY, E. A.; FISHER, D. T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 335–349, 2015.

EYKEN, E. B. B. D'O. V.; MORAES, C. L. Prevalência de fatores de risco para doenças cardiovasculares entre homens de uma população urbana do Sudeste do Brasil, **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 111-123, 2009.

FENG, Y.; YANG, S.; MA, Y.; BAI, X. Y.; CHEN, X. Role of Toll-like receptors in diabetic renal lesions in a miniature pig model. **Sci Adv**, v. 1, n. 5, 2015.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M. et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor- α receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. **Diabetes care**, v. 23, n. 6, p. 831–7, jun. 2000.

FERRAZ, E. G.; DA SILVEIRA, B. B. B.; SARMENTO, V. A.; DOS SANTOS, J. N. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **Rev Gaucha Odontol.**, v. 59, n. 3, p. 483-490, 2011.

FERWERDA, B. et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 14, n. 5–6, p. 346–52, 2008.

FRANTZ, S.; ERTL, G.; BAUERSACHS, J. Mechanisms of Disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. 8, 2007.

FRAUNBERGER, P. et al. Association of serum tumor necrosis factor levels with decrease of cholesterol during septic shock. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 10, n. 5, p. 359–63, 1998.

GASTEIGER, G.; RUDENSKY, A. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 631–639, 2014.

GERALDO, J. M.; ALFENAS, R. C. G. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica - evidências atuais. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 6, 2008.

GHADERIAN, S. M.; AKBARZADEH NAJAR, R.; TABATABAEI PANAHI, A. S. Tumor necrosis factor- α : investigation of gene polymorphism and regulation of TACE-TNF- α system in patients with acute myocardial infarction. **Mol Biol Rep**, 2010.

GHOSH, S.; DASS, J. F. P. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. **Gene**, v. 584, n. 1, p. 97–109, 2016.

GIALAFOS, E.; TRIPOSKIADIS, F.; KOURANOS, V.; RAPTI, A.; KOSMAS, I.; MANALI, E.; GIAMOUZIS, G.; ELEZOGLU, A.; PEROS, I.; ANAGNOSTOPOULOU, O.; KOULOURIS N.; GAZOULI, M. Relationship between tumor necrosis factor- α (TNF α) gene polymorphisms and cardiac sarcoidosis. **In Vivo**, v. 28, n. 6, p. 1125-9, 2014.

GLEZERA, I.; MARCOURAKISA, T.; AVELLARC, M. C. W.; GORENSTEINA, C.; SCAVONEA, C. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 22, n. 1, p. 26-30, 2000.

GOLOVKIN, A. S.; PONASENKO, A. V.; KHUTORNAYA, M. V.; KUTIKHIN, A. G.; SALAKHOV, R. R.; YUZHALLIN, A. E.; ZHIDKOVA, I. I.; BARBARASH, O. L.; BARBARASH, L. S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. **Gene**, v. 550, n. 1, p. 101-9, 2014.

GÓMEZ, D.; DIEHL, M. C.; CROSBY, E. J.; WEINKOPFF, T.; DEBES, G.F. Effector T Cell Egress via Afferent Lymph Modulates Local Tissue Inflammation. **J Immunol.**, v. 195, n. 8, p. 3531-6, 2015.

GOUNI, I. et al. Endotoxin-induced hypertriglyceridemia is mediated by suppression of lipoprotein lipase at a post-transcriptional level. **Journal of lipid research**, v. 34, n. 1, p. 139–46, 1993.

GROHE, S. S.; STUBER, F.; BOOK, M. TNF- α Promoter Polymorphism in Relation to TNF- α Production and Clinical Status in Cystic Fibrosis. **Lung**, v. 184, p. 99–104, 2006.

GUVEN, M.; ISMAILOGLU, Z.; BATAR, B.; UNAL, S.; ONARAN, I.; KARADAG, B.; ONGEN, Z. The effect of genetic polymorphisms of TLR2 and TLR4 in Turkish patients with coronary artery disease. **Gene**, v. 558, n. 1, p. 99-102, 2015.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v.352, p. 1685-1695, 2005.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P.; SCHONBECK, U.; YAN, Z-Q. Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 91, p. 281-291, 2002.

HANSSON, K.K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double edged sword. **Nature reviews immunology**, v. 6, p. 508-519, 2006.

HASSAN, S. et al. Effects of anti-TNF- α treatment on lipid profile in rheumatic diseases: an analytical cohort study. **Arthritis Research & Therapy**, v. 18, n. 1, p. 261, 2016.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v.132, n. 3, p. 344-362, 2008.

HEIDARI, M. M. et al. Polymorphisms in NOS3, MTHFR, APOB and TNF- α Genes and Risk of Coronary Atherosclerotic Lesions in Iranian Patients. **Research in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 1, 2015.

HOAREAU, L. et al. Signaling pathways involved in LPS induced TNF α production in human adipocytes. **Journal of Inflammation**, v. 7, n. 1, p. 1, 2010.

HOLD, G. L.; RABKIN, C. S.; GAMMON, M. D.; BERRY, S. H.; SMITH, M. G.; LISSOWSKA, J.; RISCH, H. A.; CHOW, W. H.; MOWAT, N. A.; VAUGHAN, T. L.; EL-OMAR, E. M. CD14-159C/T and TLR9-1237T/C polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in Caucasian populations. **Eur J Cancer Prev**, v. 18, n. 2, p. 117-9, 2009.

HOLLOWAY, J. W.; YANG, I. A.; YE, S. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. **Pharmacogenet Genomics**, v.15, p. 15–21, 2005.

HORKKO, S.; BINDER, C. J.; SHAW, P.X.; CHANG, M.K.; SILVERMAN, G.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L. Immunological responses to oxidized LDL. **Free Radic Biol Med**, v. 28, p. 1771-9, 2000.

HUBACEK, J. A.; PIT'HA, J.; SKODOVÁ, Z.; STANEK, V.; POLEDNE, R. C(–260)→T Polymorphism in the Promoter of the CD14 Monocyte Receptor Gene as a Risk Factor for Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 99, p. 3218-3220, 1999.

HUDSON, L.D.; RAPALA, A.; KHAN, T.; WILLIAMS, Bryan, VINER, R. M. Evidence for contemporary arterial stiffening in obese children and adolescents using pulse wave velocity: A systematic review and meta-analysis. **Atherosclerosis**, v. 241, p. 376-86, 2015.

HUGHAN, K. S.; TFAYLI, H.; WARREN-ULANCH, J. G; BARINAS-MITCHELL, E.; ARSLANIAN, S. A. Early Biomarkers of Subclinical Atherosclerosis in Obese Adolescent Girls with Polycystic Ovary Syndrome. **J Pediatr.**, 2015.

HUSSAIN, S.; IQBAL, T.; JAVED, Q. TNF-alpha-308G>A polymorphism and the risk of familial CAD in a Pakistani population. **Human Immunology**, v. 76, p. 13-18, 2015.

HUNTER, R. B.; KANDARIAN, S. C. Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 10, p. 1504–1511, 2004.

JIA, S-J.; NIU, P-P.; CONG, J-Z.; ZHANG, B-K.; ZHAO, M. TLR4 signaling: A potential therapeutic target in ischemic coronary artery disease. **International Immunopharmacology**, 2014.

KARBAN, A. S.; OKAZAKI, T.; PANHUYSSEN, C. I.; GALLEGOS, T.; POTTER, J. J.; BAILEY-WILSON, J. E.; SILVERBERG, M. S.; DUERR, R. H.; CHO, J. H.; GREGERSEN, P. K.; WU, Y.; ACHKAR, J. P.; DASSOPOULOS, T.; MEZEY, E.; BAYLESS, T. M.; NOUVET, F. J.; BRANT, S. R. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. **Hum Mol Genet**, v. 13, n. 1, p. 35-45, 2004.

KIECHL, S.; LORENZ, E.; REINDL, M.; WIEDERMANN, C.J.; OBERHOLLENZER, F.; BONORA E.; WILLEIT, J.; SCHWARTZ, D.A. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. **N Engl J Med**, v. 347, n. 3, p. 185-92, 2002.

KIM, E. J.; CHUNG, W. C.; LEE, K. M; PAIK, C. N.; JUNG, S. H.; LEE, B. I.; CHAE, H. S.; CHOI, K. Y. Association between toll-like receptors/CD14 gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in Korean population. **J Korean Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 72-7, 2012.

KLINE, K. P.; CONTI, R. C.; WINCHESTER, D. E. Historical perspective and contemporary management of acute coronary syndromes: from MONA to THROMBINS2. **Postgrad Med**, p. 1–8, 2015.

KOCH, W. et al. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. **European Heart Journal**, v. 27, n. 21, p. 2524–2529, 2006.

KOLB, H.; MANDRUP-POULSEN, T. An immune origin of type 2 diabetes? **Diabetologia**, v. 48, n. 6, p. 1038–1050, 2005.

KOLZ, M. et al. Association between variations in the TLR4 gene and incident type 2 diabetes is modified by the ratio of total cholesterol to HDL-cholesterol. **BMC medical genetics**, v. 9, 2008.

KONDO, T.; OHNO, M.; SHIMOKATA, K.; LINO, S.; INDEN, Y.; MUROHARA, HIRAI, M. CD14 promoter polymorphism is associated with acute myocardial infarction resulting from insignificant coronary artery stenosis. **Heart**, v. 89, n. 8, p. 931-932, 2003.

KUBASZEK, A. et al. Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1872–6, 2003.

KUTIKHIN, A. G. et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. **Meta Gene**, v. 9, p. 76–89, 2016.

LABRUM, R.; BEVAN, S.; SITZER, M.; LORENZ, M.; MARKUS, H. S. Toll Receptor Polymorphisms and Carotid Artery Intima-Media Thickness. **Stroke**, 2007.

LACKEY, D.E.; OLEFSKY, J.M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nat Rev Endocrinol**, 2015.

LAHIRI, D. K.; NUMBERGER, J. I. JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAI, H. M.; LI, X. M.; YANG, Y. N.; MA, Y. T.; XU, R.; PAN, S.; ZHAI, H.; LIU, F.; CHEN, B. D.; ZHAO, Q. Genetic Variation in NFKB1 and NFKBIA and Susceptibility to Coronary Artery Disease in a Chinese Uygur Population. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

LI, J.; YIN, Q.; WU, H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. **Adv Immunol.**, v. 119, p.135-53, 2013.

LI, K. et al. The Analysis of microRNA Expression Profiling for Coronary Artery Disease. **Cardiology**, v. 127, n. 1, p. 62–69, 2014.

LI, X.; ZHANG, C.; QIAO, W.; ZHOU, X.; SUN, M. NFKB1 -94ins/del ATTG polymorphism increases osteosarcoma risk in a Chinese Han population. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 1, p.1420-1423, 2015.

LI, Y. Y.; WANG, X. M.; ZHOU, C. W.; XU, J.; QIAN, Y. CD14 gene-159C/T polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis involving 4467 subjects. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 8, p. 12149-60, 2015.

LIANG, J. et al. Naringin regulates cholesterol homeostasis and inhibits inflammation via modulating NF- κ B and ERK signaling pathways in vitro. **Die Pharmazie**, v. 71, n. 2, p. 101–8, 2016.

LIAQUAT, A.; ASIFA, G. Z.; ZEENAT, A.; JAVED, Q. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 gene and C-reactive protein profiles in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Ann Saudi Med**, v. 34, n. 5, p. 407-14, 2014.

LIBRANDI, A. P. L.; PANDOCHI, A. I. A. O envolvimento do sistema complemento nos processos de aterogênese. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 41, n. 3, p. 312-26, 2008.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n.3, 2006.

LIMA-NETO, L. G.; HIRATA, R. D. C.; LUCHESSI, A. D.; SILBINGER, V. N.; STEPHANO, M. A. SAMPAIO, M. F.; ARMAGANIAN, D.; HIRATA, M. H. CD14 and IL6 polymorphisms are associated with a pro-atherogenic profile in young adults with acute myocardial infarction. **J Thromb Thrombolysis**, 2012.

LIN, C.-P. et al. Simvastatin Attenuates Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and Artery Calcification in LDLR-/- Mice Fed with High Fat Diet via Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α and TNF Receptor 1. **PloS one**, v. 10, n. 12, 2015.

LIU, F.; LU, W.; QIAN, Q.; QI, W.; HU, J.; FENG, B. Frequency of TLR 2, 4, and 9 Gene Polymorphisms in Chinese Population and Their Susceptibility to Type 2 Diabetes and Coronary Artery Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

LIU, X. Q.; YANG, J. Y. The association between C-159T polymorphism in promoter region of CD14 polymorphism and coronary heart disease. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, v. 20, p: 427–9, 2010.

LOPEZ, N.J.; QUINTERO, A.; LLANCAQUEO, M.; JARA, L. Effects of periodontal therapy on markers of systemic inflammation in patients with coronary heart disease risk. **Rev Med Chil**, v. 137, n. 10, p.1315-22, 2009.

LÓPEZ-MEJÍAS, R.; GARCÍA-BERMÚDEZ, M.; GONZÁLEZ-JUANATEY, C.; CASTAÑEDA, S.; MIRANDA-FILLOY, J. A.; GÓMEZ-VAQUERO, C.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, B.; Balsa A.; PASCUAL-SALCEDO, D.; BLANCO, R.; GONZÁLEZ-ÁLVARO, I.; LLORCA, J.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ-GAY, M. A. NFKB1-94ATTG ins/del polymorphism (rs28362491) is associated with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 426-9, 2012.

LOTUFO, P. A. O escore de risco de Framingham para doenças Cardiovasculares. **Rev Med**, v. 87, n. 4, p. 232-7, 2008.

MACHADO-CRUZ, S. S.; CARVALHO-SOUZA, C. E.; TAMURA, E. K.; PINATO, L.; CECON, E.; FERNANDES, P. A. C. M.; DE AVELLAR, M. C. W.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **J. Pineal Res.**, v. 49, p. 183–192, 2010.

MALLIK, S.; MAJUMDER, P. P. A two-step genetic study on quantitative precursors of coronary artery disease in a homogeneous Indian population: case-control association discovery and validation by transmission-disequilibrium test. **Journal of biosciences**, v. 36, n. 5, p. 857–68, 2011.

MCGILL, H. C. JR.; MCMAHAN, C.A.; ZIESKE, A.W.; TRACY, R.E.; MALCOM, G.T.; HERDERICK, E. E.; STRONG, J.P. Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. **Circulation**, v. 102, p. 374-9, 2000.

MEIGS, J. B. Epidemiology of cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v. 40, p. s358–s361, 2003.

MERTENS, J. et al. Functional impact of endotoxin receptor CD14 polymorphisms on transcriptional activity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, n. 8, p. 815–824, 2009.

MESQUITA, E. T.; SOCRATES, J.; RASSI, S.; VILLACORTA, H.; MADY, C. Insuficiência cardíaca com função sistólica preservada. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 82, n.5, 2004.

MINEGISHI, Y. et al. Deletion of nuclear factor-κB p50 upregulates fatty acid utilization and contributes to an anti-obesity and high-endurance phenotype in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 6, 2015.

MIRHAFEZ, S. R.; AVAN, A.; PASDAR, A.; KAZEMI, E.; GHASEMI, F.; TAJBAKHSH, A.; TABAEE, S.; FERNS, G. A.; GHAYOUR-MOBARHAN, M. Association of tumor necrosis factor-α promoter G-308A gene polymorphism with

increased triglyceride level of subjects with metabolic syndrome. **Gene**, v. 568, n. 1, p. 81-4, 2015.

MISHRA, A.; SRIVASTAVA, A.; MITTAL, T.; GARG, N.; MITTAL, B. Role of inflammatory gene polymorphisms in left ventricular dysfunction (LVD) susceptibility in coronary artery disease (CAD) patients. **Cytokine**, v. 61, p. 856-861, 2013.

MOHD SUZAIRI, M. S.; TAN, S. C.; AHMAD AIZAT, A. A.; MOHD AMINUDIN, M.; SITI NURFATIMAH, M. S.; ANDEE, Z. D.; ANKATHIL, R. The functional -94 insertion/deletion ATTG polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer. **Cancer Epidemiol**, v. 37, p. 634-8, 2013.

MORANGE, P. E.; TIRET, L.; SAUT, N.; LUC, G.; ARVEILER, D.; FERRIERES, J.; AMOUYEL, P.; EVANS, A.; DUCIMETIERE, P.; CAMBIEN, F.; JUHAN VOGUE, I. TLR4/Asp299Gly, CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: The PRIME Study. **European Journal of Human Genetics**, v. 12, p. 1041–1049, 2004.

NAIR, J.; GHATGE, M.; KAKKAR, V. V.; SHANKER, J. Network analysis of inflammatory genes and their transcriptional regulators in coronary artery disease. **PLOS ONE**, v. 9, n.4, 2014.

NAKADA, T. A.; HIRASAWA, H.; ODA, S.; SHIGA, H.; MATSUDA, K.; NAKAMURA, M.; WATANABE, E.; ABE, R.; HATANO, M.; TOKUHIISA, T. Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. **J Surg Res**, v. 129, n. 2, p. 322-8, 2005.

NAUCK, M.; WINKELMANN, B. R.; HOFFMANN, M. M.; BÖHM, B. O.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. C(-260)T polymorphism in the promoter of the CD14 gene is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. **Am J Cardiol**. v. 90, n. 11, p. 1249-52, 2002.

NDIAYE, N. C.; NEHZAD, M. A.; EL SHAMIEH, S.; STATHOPOULOU, M. G.; VISVIKIS-SIEST, S. Cardiovascular diseases and genome-wide association studies. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 19-20, p.1697-70, 2011.

NERI SERNERI, G. G.; COPPO, M.; BANDINELLI, M.; PAOLETTI, P.; TOSCANO, T.; MICALIZZI, E.; CHIOSTRI, M.; BODDI, M. Exaggerated myocardial oxLDL amount and LOX-1 receptor over-expression associated with coronary microvessel inflammation in unstable angina. **Atherosclerosis**, v. 226, n. 2, p. 476-82, 2013.

NETHAN, C. Point of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

PAPADIMITRIOU, L.; KALOGEROPOULOS, A. P. Inflammatory Biomarkers and Therapeutic Targets in Heart Failure. **Curr Med Chem**, v. 22, n. 23, p. 2716-26, 2015.

PARK, M. H.; SKOW, Á.; DE MATTEIS, S.; KESSEL, A.S. SAXENA, S. VINER, R. M.; KINRA, S. Adiposity and carotid-intima media thickness in children and adolescents: a systematic review. **BMC Pediatr.**; v.15, n. 161, 2015.

PASTERKAMP, G.; VAN KEULEN, J. K.; DE KLEIJN, D. P. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. **Eur J Clin Investig**, v. 34, p. 328–334, 2004.

PEDEN, J. F.; FARRALL, M. Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 2, p. 198-205, 2011.

PEETERS, H.; BOGAERT, S.; LAUKENS, D.; ROTTIERS, P.; DE KEYSER, F.; DARFEUILLE- MICHAUD, A.; GLASSER, A. L.; ELEWAUT, D.; DE VOS, M. CARD15 variants determine a disturbed early response of monocytes to adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 in Crohn's disease. **Int J Immunogenet**, v. 34, n. 3, p. 181-91, 2007.

PEREIRA, S. G.; OAKLEY, F. Nuclear factor- κ B1: Regulation and function. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 8, p. 1425–1430, 2008.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 49–62, 2007.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 347, p. 417-429, 2002.

QIU, H. N.; LIU, B.; LIU, W.; LIU, S. Interleukin-27 enhances TNF- α -mediated activation of human coronary artery endothelial cells. **Mol Cell Biochem**, 2015.

RAJASURIAR, R.; KONG, Y. Y.; NADARAJAH, R.; ABDULLAH, N. K.; SPELMAN, T.; YUHANA M. Y.; PONAMPALAVANAR, S.; KAMARULZAMAN, A.; LEWIN, S. R. The CD14 C-260T single nucleotide polymorphism (SNP) modulates monocyte/macrophage activation in treated HIV-infected individuals. **J Transl Med**, v. 27, p. 13-30, 2015.

RAMOS, A. M.; PELLANDA, L.C.; GUS, I.; PORTAL, V. L. Marcadores inflamatórios da doença cardiovascular em idosos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, n. 3, 2009.

RAZEGHI, P. et al. Lack of NF- κ B1 (p105/p50) attenuates unloading-induced downregulation of PPAR α and PPAR α -regulated gene expression in rodent heart. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 1, p. 133–139, 2007.

RIDKER, P. M.; BURING, J. E.; RIFAI, N.; COOK, N. R. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. **JAMA**, v. 297, n. 6, p. 611-9, 2007.

RITCHIE, M. E. Nuclear factor-kappa B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. **Circulation**, v. 98, n. 17, p. 1707-13, 1998.

ROBERTS, R. Genetics of Coronary Artery Disease: An Update. **MDCVJ**, v. X, n. 1, 2014.

ROBIN, N. H.; TABEREAUX, P. B.; BENZA, R.; KORF, B. R. Genetic Testing in Cardiovascular Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 8, p. 727-737, 2007.

ROCK, F. L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, J. F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 588-593, 1998.

ROJAS, J.; SALAZAR, J.; MARTÍNEZ, M.S.; PALMAR, J.; BAUTISTA, J.; CHÁVEZ-CASTILLO, M.; GÓMEZ, A.; BERMÚDEZ, V. Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis. **Scientifica (Cairo)**, 2015.

ROMZOVA, M.; HOHENADEL, D.; KOLOSTOVA, K.; PINTEROVA, D.; FOJTIKOVA, M.; RUZICKOVA, S.; DOSTAL, C.; BOSAK, V.; RYCHLIK, I.; CERNA, M. NFkappaB and its inhibitor IkappaB in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. **Hum Immunol**, v. 67, n. 9, p. 706-13, 2006.

RUSSO, M. A. et al. One Special Question to Start with: Can HIF/NFkB be a Target in Inflammation? **Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets**, v. 15, n. 3, p. 171–85, 2015.

SALES, M. L.; SCHREIBER, R.; FERREIRA-SAE, M. C.S.; FERNANDES, M. N.; PIVETA, C.; CIPOLLI, J. A. A.; CALIXTO, A.; MATOS-SOUZA, J. R.; GELONEZE, B.; FRANCHINI, K. G.; NADRUZ, W. Jr.; The functional Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women. **Clinica Chimica Acta**, 2010.

SALIM, P. H.; XAVIER, R. M. Influência dos polimorfismos genéticos (IL10/CXCL8/CXCR2/NFkB) na susceptibilidade das doenças reumatológicas autoimunes. **Rev Bras Reumatol**, v. 54, n. 4, p. 301-10, 2014.

SAMANI, N. J.; SCHUNKERT, H. Chromosome 9p21 and cardiovascular disease: the story unfolds. **Circulation Cardiovascular Genetics**, v. 1, n. 2, p. 81-4, 2008.

SANTOS, D. G. B.; RESENDE, M. F.; MILL, J. G.; MANSUR, A. J.; KRIEGER, J. E.; PEREIRA, A. C. Nuclear Factor (NF) kB polymorphism is associated with heart function in patients with heart failure. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 89, 2010.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 37-49, 2010.

SCHLICHTING, D.; MCCOLLAM, J.S. Recognizing and managing severe sepsis: a common and deadly threat. **South Medicine Journal**, v.100, n. 6, p. 594-600, 2007.

SCHNEIDER, S.; HOPPMANN, P.; KOCH, W.; KEMMNER, S.; SCHMADERER, C.; RENDERS, L.; KASTRATI, A.; LAUGWITZ, K. L.; HEEMANN, U.; BAUMANN, M. Obesity-associated hypertension is ameliorated in patients with TLR4 single nucleotide polymorphism (SNP) rs4986790. **J Inflamm (Lond)**, v. 12, n. 57, 2015.

SCHNEIDER, S.; KOCH, W.; HOPPMANN, P.; UBRICH, R.; KEMMNER, S.; STEINLECHNER, E.; HEEMANN, U.; LAUGWITZ, K-L.; KASTRATI, A.; BAUMANN, M. Association of Toll-like receptor 4 polymorphism with age dependent systolic blood pressure increase in patients with coronary artery disease. **Immun Ageing**, v. 12, n. 4, 2015.

SCHREYER, S. A.; CHUA, S. C.; LEBOEUF, R. C. Obesity and diabetes in TNF- α receptor- deficient mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 2, p. 402–411, 1998.

SCHRÖDER, N. W.; MEISTER, D.; WOLFF, V.; CHRISTAN, C.; KANER, D.; HABAN, V.; PURUCKER, P.; HERMANN, C.; MOTER, A.; GÖBEL, U. B.; SCHUMANN, R. R. Chronic periodontal disease is associated with single nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene. **Genes Immun**, v. 6, p. 448-451, 2005.

SCHUNKERT, H.; ERDMANN, J.; SAMANI, N. J. Genetics of myocardial infarction: a progress report. **European Heart Journal**, v. 31, n. 8, p. 918-925, 2010.

SEDIRI, Y.; HAMMAMI, S.; KALLEL, A.; MOURALI, M. S. et al. C(-260)T polymorphism in the promoter of CD 14 gene is not associated with myocardial infarction in the Tunisian population. **Exp Mol Pathol.**, v. 90, n. 3, p. 276-9, 2011.

SEPPÄLÄ-LINDROOS, A. et al. Fat Accumulation in the Liver Is Associated with Defects in Insulin Suppression of Glucose Production and Serum Free Fatty Acids Independent of Obesity in Normal Men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 7, p. 3023–3028, 2002.

SHAO, L.; ZHANG, P.; ZHANG, Y.; LU, Q.; MA, A. TLR3 and TLR4 as potential clinically biomarkers of cardiovascular risk in coronary artery disease (CAD) patients. **Heart Vessels**, v. 29, p. 690-698, 2014.

SHENG, W. Y.; YONG, Z.; YUN, Z.; HONG, H.; HAI, L. L. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer: a meta-analysis and review. **Arch Med Sci**, v. 11, n. 4, p. 699-707, 2015.

SHIELS, M. S.; ENGELS, E. A.; SHI, J.; LANDI, M. T.; ALBANES, D.; CHATTERJEE, N.; CHANOCK, S. J.; CAPORASO, N. E.; CHATURVEDI, A. K. Genetic variation in innate immunity and inflammation pathways associated with lung cancer risk. **Cancer**, v. 118, p. 5630-6, 2012.

SHIMADA, K.; WATANABE, Y.; MOKUNO, H.; IWAMA, Y.; DAIDA, H.; YAMAGUCHI, H. Common polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene is associated with acute myocardial infarction in Japanese men. **Am J Cardiol**, v. 86, p. 682-4, 2000.

SILVA, M. V. F.; FERREIRA, K. S.; LOURES, C. M. G.; DUSSE, L. M. S'A.; VIEIRA, L. M.; ASSINI, A. G.; SILVEIRA, J. N.; CARVALHO, M. G. Aterotrombose e antiagregantes plaquetários. **Rev Bras Cardiol**, v. 26, n. 3, p. 221-30, 2013.

SINGH, K.; SINGH, V. K.; AGRAWAL, N. K.; GUPTA, S. K.; SINGH, K. Association of Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms with Diabetic Foot Ulcers and Application of Artificial Neural Network in DFU Risk Assessment in Type 2 Diabetes Patients. **BioMed Research International**, 2013.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R.G. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, 2006.

SKOOG, T.; DICHTL, W.; BOQUIST, S. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. **Eur Heart J**, v. 23, p. 376-383, 2002.

SPIRING, R.; TSIU, J.; SHAW, S. The Emerging Role of TLR and Innate Immunity in Cardiovascular Disease. **Cardiology Research and Practice**, 2012.

SPITZ, C.; WINKELS, H.; BÜRGER, C.; WEBER, C.; LUTGENS, E.; HANSSON, G. K.; GERDES, N. Regulatory T cells in atherosclerosis: critical immune regulatory function and therapeutic potential. **Cell Mol Life Sci**, 2015.

STEGGER, J. G. et al. Interaction between obesity and the NFKB1 - 94ins/delATTG promoter polymorphism in relation to incident acute coronary syndrome: a follow up study in three independent cohorts. **PloS one**, v. 8, n. 5, 2013.

STEINHARDT, A. P. et al. A functional nonsynonymous toll-like receptor 4 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome, surrogates of insulin resistance, and syndromes of lipid accumulation. **Metabolism**, v. 59, n. 5, p. 711–717, 2010.

STELTER, F. Structure/function relationships of CD14. **Chem Immunol**, v. 74, p. 25-41, 2000.

SUKHININA, T. S. et al. [Value of allele gene polymorphism of the inflammation system for prognosis of patients with myocardial infarction]. **Kardiologija**, v. 52, n. 3, p. 15–21, 2012.

SUN, X. F.; ZHANG, H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. **Histol Histopathol**, v. 22, n. 12, p. 1387-1398, 2007.

TAKEDA, K. The lipid a receptor. **Adv Exp Med Biol**, v. 667, p. 53-58, 2010.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; ALIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TAPP, L. D.; SHANTSILA, E.; WRIGLEY, B. J.; MONTORO-GARCIA, S.; LIP, G. Y. TLR4 expression on monocyte subsets in myocardial infarction. **J Intern Med**, v. 273, n. 3, p. 294-305, 2013.

THAMER, C. et al. High visceral fat mass and high liver fat are associated with resistance to lifestyle intervention. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 15, n. 2, p. 531–8, fev. 2007.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; JAFFE, A. S.; SIMOONS, M. L.; CHAITMAN, B. R.; Harvey D. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. **Circulation**, 2012.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária uma introdução**. 8 ed. Rio de Janeiro: Saunders:elsevier, 2009.

TUNDUP, S.; SRIVASTAVA, L.; NORBERG, T.; WATFORD, W. HARN, S. A Neoglycoconjugate Containing the Human Milk Sugar LNFP III Drives Anti Inflammatory Activation of Antigen Presenting Cells in a CD14 Dependent Pathway. **PLOS ONE**, 2015.

ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The "cytokine profile": a code for sepsis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 56-63, 2005.

UNKELBACH, K.; GARDEMANN, A.; KOSTRZEWA, M.; PHILIPP, M.; TILLMANN, H.; HABERBOSCH, W. A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, p. 932-8, 1999.

UYSAL, K. T. et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610–4, 1997.

VAINAS, T.; STASSEN, F. R. M.; BRUGGEMAN, C. A.; WELTEN, R. J. T. J.; VAN DEN AKKER, L. H. J. M.; KITSLAAR, P. J. E. H. M.; PEÑA, A. S.; MORRÉ, S. A. Synergistic effect of Toll-like receptor 4 and CD14 polymorphisms on the total atherosclerosis burden in patients with peripheral arterial disease. **Journal of Vascular Surgery**, v. 44, n. 2, 2006.

VOGEL, U.; JENSEN, M. K.; DUEE, K. M.; RIMMD, E. B.; WALLINA, H.; NIELSENE, M. R.S.; PEDERSENE, A-P. T.; TJONNELANDH, A.; OVERVADE, K. The NFKB1 ATTG ins/del polymorphism and risk of coronary heart disease in three independent populations. **Atherosclerosis**, v. 219, p. 200–204, 2011.

VOLP, A.C. P.; ALFENAS, R. C. G.; COSTA, N. M. B.; MINIM, V. P. R.; STRINGUETA, P. C.; BRESSAN, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n.3, 2008.

XU, Y.; WANG, J. Association of CD14 gene -159C/T polymorphism with allergic rhinitis risk: a meta-analysis. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, 2013.

WILSON, P. W.; D'AGOSTINO, R. B.; LEVY, D.; BELANGER, A. M.; SILBERSHATZ, H.; KANNEL, W. B. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. **Circulation**, v. 97, p. 1837-1847, 1998.

WEYRICH, P. et al. The D299G/T399I Toll-like receptor 4 variant associates with body and liver fat: results from the TULIP and METSIM Studies. **PloS one**, v. 5, n. 11, 2010.

WONG, S. W. et al. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27384–92, 2009.

World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) - 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em 20 de agosto de 2016.

World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) - 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em 20 de agosto de 2016.

YANG, I. A.; HOLLOWAY, J. W.; YE, S. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. **Atherosclerosis**, v.170, p.187–190, 2003.

YANG, Y. N.; ZHANG, J. Y.; MA, Y. T.; XIE, X.; LI, X. M.; LIU, F.; CHEN, B. D.; DONG, X. H.; ZHENG, Y. Y.; PAN, S.; ZHAI, H.; LI, D. Z.; CHEN, Q. J. -94 ATTG insertion/deletion polymorphism of the NFKB1 gene is associated with coronary artery disease in Han and Uygur women in China. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 18, n. 6, p. 430-8, 2014.

YE, J.; MCGUINNESS, O. P. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 5, p. E466–E477, 2013.

YIN, Y. W.; SUN, Q. Q.; HU, A. M.; LIU, H. L.; WANG, Q.; ZHANG, B. B. Toll like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism in myocardial infarction: a meta analysis of 15,148 subjects. **Hum Immunol**, v. 75, n. 2, p. 63-9, 2014.

YIN, Y.-W. et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism in ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis. **International Journal of Neuroscience**, v. 124, n. 4, p. 252–260, 2014.

YONG, Y. K. et al. Genetic polymorphisms in the CD14 gene are associated with monocyte activation and carotid intima-media thickness in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. **Medicine**, v. 95, n. 31, 2016.

YOSHINO, S. et al. Sex-Specific Genetic Variants are Associated With Coronary Endothelial Dysfunction. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 4, 2016.

ZDRAVKOVIC, S.; WIENKE, A.; PEDERSEN, N. L.; DE FAIRE, U. Genetic influences on angina pectoris and its impact on coronary heart disease. **Eur J Hum Genet**, v. 15, p. 872–7, 2007.

ZDRAVKOVIC, S.; WIENKE, A.; PEDERSEN, N. L.; MARENBERG, M. E.; YASHIN, A. I.; DE FAIRE, U. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. **J Intern Med**, v. 252, p. 247–54, 2002.

ZEE, R. Y.; BATES, D.; RIDKER, P. M. A prospective evaluation of the CD14 and CD18 gene polymorphisms and risk of stroke. **Stroke**, v. 33, p. 892-5, 2002.

ZHANG, H-F.; XIE, S-L.; WANG, J-F.; CHEN, Y-X.; WANG, Y.; HUANG, T-C. Tumor necrosis factor-alpha G-308A gene polymorphism and coronary heart disease susceptibility: An updated meta-analysis. **Thrombosis Research**, v. 127, p. 400–405, 2011.

ZHANG, J.; WANG, D.; HE, S. Roles of antibody against oxygenized low density lipoprotein in atherosclerosis: recent advances. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 8, 2015.

ZHANG, L.; XU, A. G.; ZHAO, W.; XU, Q. F.; ZHAO, Y. M.; LI, D. D.; SHI, X. Y.; ZHAO, J. J. A toll-like receptor 4 (TLR4) variant is associated with asthma severity. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 5, p. 7849-54, 2015.

ZHANG, K.; ZHANG, L.; ZHOU B, WANG, Y.; SONG, Y.; RAO, L.; ZHANG, L. Lack of association between TLR4 Asp299Gly polymorphism and atherosclerosis: evidence from meta-analysis. **Thromb Res**, v. 130, n. 4, p. 203-8, 2012.

ZHOU, B.; RAO, L.; PENG, Y.; WANG, Y.; LI, Y.; GAO, L.; CHEN, Y.; XUE, H.; SONG, Y.; LIAO, M.; ZHANG, L. Functional polymorphism of the *NFKB1* gene promoter is related to the risk of dilated cardiomyopathy. **BMC Medical Genetics**, v.10, n. 47, 2009.

ZHOU, Y.-D. et al. Rapamycin Inhibits Oxidized Low Density Lipoprotein Uptake in Human Umbilical Vein Endothelial Cells via mTOR/NF-κB/LOX-1 Pathway. **PloS one**, v. 11, n. 1, 2016.

ANEXOS

ANEXO 1- TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: Aspectos Moleculares das Doenças Multifatoriais.

A doença coronariana (entupimento dos vasos do coração) é uma das principais causas de doenças do coração, tendo como consequência angina (dores no peito), infarto do miocárdio (ataque cardíaco), e outras manifestações. Atualmente se sabe que, além dos hábitos de vida das pessoas, existe influência de fatores genéticos na ocorrência desta doença.

Este estudo pretende avaliar algumas características genéticas em pessoas que tem doença coronariana e em pessoas que não tem esta doença, para saber se estas características realmente são associadas à ocorrência destas doenças cardíacas. Para isso será pesquisada uma região do código genético, ou seja, com uma amostra de sangue será feito um exame para identificar um pequeno pedacinho da sua genética, que pode estar relacionado à maior facilidade de desenvolver doença coronariana. E também serão realizados exames básicos de laboratório, para a dosagem de colesterol, glicose, enzimas, entre outros. Estes resultados serão analisados pelos pesquisadores, no Centro Universitário Univates, e podem futuramente contribuir para o melhor diagnóstico, prevenção e tratamento de casos de doença coronariana.

Se você aceitar participar deste estudo, na hora do cateterismo, o médico que fará o procedimento vai coletar uma amostra de sangue (igual à coletada para exames de laboratório). Esta coleta será feita na mesma "picada" que o médico faz para o exame, ou seja, você não será picado mais uma vez para participar da pesquisa, não provocando nenhum desconforto além do previsto pelo exame de cateterismo. Também serão realizadas algumas perguntas para você, em entrevista em local reservado, sobre informações importantes para o estudo, levando em torno de 15 min.

A participação na pesquisa não envolve nenhum tipo de gasto financeiro por parte do participante, e nem traz riscos à sua saúde, visto que os procedimentos serão feitos no mesmo momento e local do exame de cateterismo. Os desconfortos previstos seriam somente o tempo de responder às perguntas da entrevista e o possível constrangimento diante de alguma pergunta, sendo que a entrevista pode ser interrompida e retomada mais tarde, se necessário. Ainda, o participante não terá nenhum benefício financeiro por participar deste estudo. Os desconfortos relativos ao exame de cateterismo já foram ou serão explicados pela equipe do hospital.

Você deve saber que pode solicitar esclarecimentos sobre a sua participação no estudo a qualquer momento, e também de que é livre para retirar o seu consentimento, se assim o desejar, sem nenhum impacto sobre o seu atendimento no hospital. As informações obtidas neste estudo serão analisadas pela equipe de pesquisadores, garantindo o sigilo dos nomes e informações, ou seja, o seu nome nunca será divulgado, e os seus resultados serão

analisados em conjunto com os de outros participantes, não sendo possível identificar nenhum participante individualmente. Os resultados serão divulgados em eventos científicos e publicados para conhecimento da comunidade científica, sempre com a garantia de que os participantes não serão identificados.

A coordenadora da pesquisa é a Profa. Verônica Contini, professora da UNIVATES, que está à disposição para o esclarecimento de dúvidas que for necessário, no telefone 37147000, ramal 5534.

Este projeto de pesquisa foi analisado quanto ao atendimento de exigências éticas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Univates, sendo aprovado.

Aceitando participar do estudo, você deve assinar este termo em duas vias (ficando uma com você e outra com os pesquisadores).

Declaração do participante:

Declaro que li o termo acima, e que tive todas as informações necessárias sobre o projeto, e assim, aceito participar, como voluntário, deste estudo.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

Nome do pesquisador entrevistador

Assinatura do pesquisador entrevistador

Testemunha

Assinatura da testemunha

ANEXO 2- QUESTIONÁRIO SEMIESTRUTURADO

Centro Universitário UNIVATES

Aspectos Moleculares das Doenças Multifatoriais

Nome: _____ Código: _____

Entrevistador: _____ Data: ____/____/____

Dados sócio-demográficos:

A. **Endereço:** _____

B. **Cidade:** _____ C. **Residência:** 1.() Rural 2. () Urbana

D. **Telefone para contato:** (____) _____ Outro telefone: (____) _____

E. **Estado civil:** 1.() Solteiro 2. () Casado(a)/vive com companheiro(a)

F. **Sexo:** 1. () Feminino 2. () Masculino

G. **Idade:** _____

H. **Anos de estudo:** _____

I. 1.() Analfabeto 2. () Ensino fundamental incompleto (1º grau incompleto) 3. () Ensino fundamental completo (1º grau completo) 4. () Ensino médio (2º grau incompleto) 5.() Ensino médio completo (2º grau completo) 6.() Ensino superior incompleto (3º grau incompleto) 7. () Ensino superior completo (3º grau completo) 8.() Pós-graduação

J. **Profissão/Ocupação:** 1.() Aposentado 2.() Do lar 3.() Comerciante 4. () Autônomo 5.() Outro. Qual? _____

K. **Plano de saúde:** 1.() SUS 2. () Particular. Qual? _____

Tabagismo:

L. **Fuma:** 1.() Sim 2.() Não

M. **Abstinência ao fumo:** 1.() Não fuma há menos de um ano 2.() Entre um e dez anos 3.() 10 a 20 anos

4.() 20 a 30 anos 5.() 30 a 40 anos 6.() mais de 40 anos 7.() Não se aplica

N. **Tem contato com fumantes ativos** (sendo você fumante passivo)? 1.() Sim 2.() Não

O. **Qual ambiente de contato com fumantes?** 1.() domicílio 2.() bares, ambientes de lazer

3.() ambiente laboral 4.() locais públicos abertos e/ou fechados 5. () outro 6.() Não se aplica

P. **Se fuma, quantos cigarros por dia:** 1.() Nenhum 2.() um a 10 cigarros 3.() 10 a 20 cigarros

4.() 20 a 30 cigarros 5.() 30 ou mais cigarros

Alcoolismo e outras drogas:

Q. **Consome bebidas alcoólicas regularmente:** 1.() Sim 2.() Não

R. **Frequência:** 1.() até duas vezes por sem 2.() 3 a 4 vezes por semana 3.() 5 a 7 dias por semana

S. **Se já foi alcoolista, qual é o tempo de abstinência ao álcool:** 1.() Não bebe há menos de um ano 2.() entre um e dez anos 3.() 10 a 20 anos 4.() 20 a 30 anos 5.() 30 a 40 anos 6.() mais de 40 anos 7.() NA

T. **Utiliza alguma das seguintes drogas:** 1.() maconha 2.() cocaína 3.() crack 4.() outra

História familiar:

U. **Tem história de doença cardiovascular na família?** 1.() Sim 2.() Não

V. **Qual é a doença:**

X. **Qual é o parentesco?** 1.() Mãe 2.() Pai 3.() Irmãos 4.() Avós por parte de mãe 5.() Avós por parte de pai 6.() Tios 7.() Primos

Y. **Atividade física regular:** 1.() 1Xsem 2.() 2Xsem 3.() 3 a 4Xsem 4.() 5 a 7Xsem

INFORMAÇÕES MÉDICAS

AA. **Diagnóstico/sintomas anteriores ao cateterismo:**

AB. **Indicação do cateterismo:**

AC. **Resultado do cateterismo:**

AD. **Medicamentos utilizados:**

AE. **Altura:** _____ m **AF. Peso:** _____ Kg **AG. IMC:** _____ **AH. circ. cintura:** _____ cm

AI. **Achados eletrocardiográficos:**

AJ. **Pressão arterial - data da última verificação:** ____/____/20____

AK. **Pressão sistólica:** ____ mmHg **Pressão Diastólica:** ____ mmHg

AL. **Tempo de jejum:** _____ h

AM. **Observações:**
